

Journal of
Embryology and Experimental
Morphology

VOLUME 2

September 1954

PART 3

PUBLISHED FOR THE COMPANY OF BIOLOGISTS LIMITED

OXFORD : AT THE CLARENDON PRESS

EDITORIAL BOARD

- | | |
|---------------------------------|------------------------------|
| M. ABERCROMBIE (London) | SIDNIE M. MANTON (London) |
| G. R. DE BEER (London) | P. B. MEDAWAR (London) |
| J. D. BOYD (Cambridge) | D. R. NEWTH (London) |
| J. BRACHET (Brussels) | J. PASTEELS (Brussels) |
| F. W. R. BRAMBELL (Bangor) | CHR. P. RAVEN (Utrecht) |
| A. M. DALCQ (Brussels) | A. STEFANELLI (Rome) |
| E. FAURÉ-FREMIET (Paris) | S. TOIVONEN (Helsinki) |
| HONOR B. FELL (Cambridge) | C. H. WADDINGTON (Edinburgh) |
| W. J. HAMILTON (London) | M. W. WOERDEMAN (Amsterdam) |
| J. HOLTFRETER (Rochester, N.Y.) | ET. C. WOLFF (Strasbourg) |
| S. HÖRSTADIUS (Uppsala) | J. Z. YOUNG (London) |
| F. E. LEHMANN (Bern) | S. ZUCKERMAN (Birmingham) |

Editor: M. ABERCROMBIE

INFORMATION ABOUT THE JOURNAL

The main object of the Journal is to bring together work concerned with all the kinds of developmental process to be found in animals at any stage of their life-history. It will include work on embryology (descriptive, experimental, chemical, physiological), on regeneration and healing, on the developmental changes involved in functional adaptation, on growth, ageing, and other aspects of late morphogenesis. It will publish studies of gametes and gametogenesis where the work is not primarily of cytological interest; and studies of developmental genetics and of the physiology of reproduction where these fall more within its scope than within the usual scope of existing specialized journals. Papers on those aspects of protozoology which have a bearing on morphogenesis will be acceptable. Papers concerned with developmental processes in plants may be included if they connect with zoological aspects of morphogenesis.

The papers published will for the most part be accounts of finished pieces of research. Preliminary reports will not be published. Theses and very long papers are unlikely to be accepted at present. Theoretical and review papers may be published from time to time, as space allows. Contributions may be in English, French, or German. Contributors wishing to use other languages should consult the Editor.

Journal of Embryology and Experimental Morphology is published quarterly. Subscription price £4. 4s. Od. yearly for the four numbers; for this sum (*prepaid*) the Journal is sent Post Free to any part of the world. Separate numbers price 25s. Correspondence, except that about the subject-matter of the Journal which should be sent to the Editor, should be addressed to the Publisher:

GEOFFREY CUMBERLEGE

OXFORD UNIVERSITY PRESS, AMEN HOUSE, LONDON, E.C. 4

Neural Activation and Transformation in Explants of Competent Ectoderm under the Influence of Fragments of Anterior Notochord in Urodeles

by P. D. NIEUWKOOP and G. V. NIGTEVECHT¹

From the Hubrecht Laboratory, Utrecht

Dedicated to PROFESSOR DR. F. BALTZER on his seventieth birthday

INTRODUCTION

EXPERIMENTS in which folds of competent ectoderm were attached to neural plates of host embryos at various cranio-caudal levels (Nieuwkoop *et al.*, 1952) suggested that two successive influences emanate from the underlying arachniteron roof: a *first* one representing a more or less non-specific activation which leads autonomously to a differentiation in a prosencephalic direction; and a *second* one transforming these prosencephalic differentiation tendencies into more caudal ones leading to the formation of rhombencephalon and spinal cord.

The work of Eyal-Giladi (1954) in which the temporal and spatial relations of neural induction were analysed by means of an interruption of the induction at various stages of development and at various cranio-caudal levels of the presumptive neural area showed very clearly that during gastrulation two successive waves of induction actually pass through the presumptive neuro-ectoderm in a caudo-cranial direction. The first wave, which emanates from the presumptive prechordal material, leads to an activation of the ectoderm and its autonomous development in a prosencephalic direction. This wave of activation is immediately followed by a second wave of transformative influences from the chordomesodermal plate. The quantitative interaction of these two influences was therefore made responsible for the well-known cranio-caudal segregation and differentiation of the central nervous system.

Implantation of folds of competent ectoderm in the presumptive rhombencephalic or spinal cord regions of neurula hosts—in which gastrulation had already been completed for some time—showed that at these stages also both activation and transformation act upon the implant at these levels, leading to the development of a whole series of brain parts from telencephalon to rhombencephalon or spinal cord. These influences may, however, either originate from

¹ Authors' Address: Hubrecht Laboratory, Janskerkhof 2, Utrecht, Netherlands.

the surrounding neural plate material, upon which during gastrulation both influences had already been exerted by the successive regions of the archenteron roof passing underneath, or the underlying archenteron roof can be made directly responsible if we assume that from its successive crano-caudal regions activating and transforming influences emanate in varying proportions.

A second point which needed further analysis concerns the penetration of activating and transforming influences into the attached ectodermal fold. In all instances the more cranial brain structures were located in the apical portions of the neuralized region of the fold, whereas the more caudal structures were always found in the basal portion in contact with the corresponding structures of the host. It therefore seems as if the activating influence penetrates further and more easily into the fold than the transforming one.

In general, in these experiments the activation penetrated into the attached fold over a considerable distance which was more or less equivalent to the lateral extension of the neural plate of the host from the point of attachment of the fold (cf. Nieuwkoop *et al.*, 1952, part I). Attachment in the midline near the tip of the notochord gave rise to the strongest activation, whereas in the case of a more lateral implantation a smaller region of the fold was activated. The same differences between median or more lateral implantations held for more cranial or caudal levels of implantation. This led to the supposition that the entire neural plate is chiefly evoked by the median region of the archenteron roof. This could be achieved by the evocation of a neural field having its highest value in the dorsal midline and extending with decrement laterally. According to this hypothesis, the more lateral portions of the archenteron roof only support this neural field but are not directly responsible for its intensity at corresponding medio-lateral levels. The inductive capacity of the more lateral regions of the archenteron roof (Raven & Kloos, 1945) leads to the assumption at least of such a supporting function.

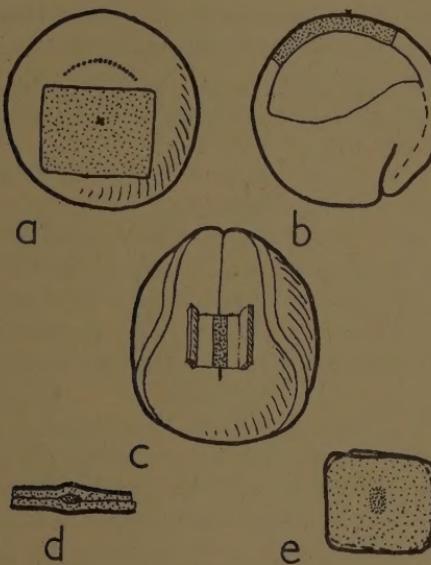
These three questions can be partially answered by a series of experiments, in which fragments of presumptive anterior notochord from a middle neurula stage were allowed to act upon competent ectoderm. The sandwich-experiment (Holtfreter, 1947, and Gallera, 1948) was chosen as the most adequate experimental condition. In other series of experiments the technique of attaching folds of competent ectoderm to various regions of the neural plate of a host embryo was used. From these latter experiments, which will not be described *in extenso*, some supplementary data were obtained concerning the penetration of the activation into the attached fold. These experiments will first be reported here.

MATERIAL AND TECHNIQUE

For the implantation of folds of competent ectoderm early gastrulae of *Ambystoma mexicanum* were used according to the technique described by Nieuwkoop *et al.* (1952). These folds were attached to neurulae of the same species.

For the sandwich experiments one of us (v. Nigtevecht) used gastrulae and neurulae of *Triturus alpestris* and *T. taeniatus*, while Nieuwkoop made a small series of similar experiments with *Ambystoma mexicanum*.

From two early gastrulae the presumptive ecto-neurodermal areas were cut off—avoiding a close approach to the presumptive marginal zone—and flattened on the wax bottom of the operation dish (see Text-fig. 1). In a mid-neurula a longitudinal cut was made in the dorsal midline and the neural plate separated from the underlying archenteron roof over some distance to the left and right sides of



TEXT-FIG. 1. Sketch of operation. *a* and *b*, removal of presumptive ecto-neuroderm from the animal pole region of an early gastrula. *c*, removal of a piece of presumptive notochord from the rhombencephalic region of a young neurula. *d* and *e*, composition of an ectodermal sandwich with a piece of notochord mounted in between the two layers of ectoderm.

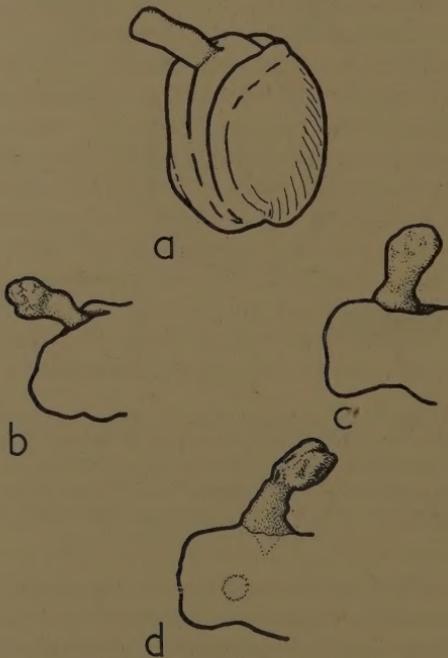
this cut. A segment was then cut out from the anterior portion of the notochord, leaving its anterior tip *in situ*. The notochord fragment was placed on top of one of the sheets of ectoderm which had been turned with its inner side upwards. The other sheet was then attached with its inner side to the exposed inner surface of the first one and both sheets with the notochord fragment between them were gently pressed together under a loaded layer of agar to ensure good attachment. These rather big flat explants were reared in a cultivation dish in Holtfreter solution without NaHCO₃ (in order to avoid a too high pH value of the medium) with or without adding Elkosine (Ciba) at 1 gramme per L. The *Triturus* explants developed very slowly, showing a very pronounced retardation in both

neural plate formation and in further development. The axolotl explants could be fixed after about 2 weeks, whereas the *Triturus* explants needed a period of 3 to 4 weeks before histological differentiation occurred.

The explants were fixed in Lenhossek's fixative and sectioned transversally (perpendicularly to the original surface planes of the flat explants) at 10μ . They were stained with Borax carmine and aniline-blue-orange G. The donors of the notochord fragments were reared as controls to confirm the regional origin of the grafts.

EXTERNAL DEVELOPMENT OF FOLDS OF COMPETENT ECTODERM
ATTACHED TO A NEURULA HOST

Using axolotl material folds can be made of rather regular and constant form. Immediately after implantation in the presumptive rhombencephalic area of the



TEXT-FIG. 2. External development of fold of competent ectoderm attached to midline of neural plate at an early neurula stage. *a*, 1 hour; *b*, 18 to 19 hours; *c*, \pm 50 hours; and *d*, \pm 100 hours after implantation.

neural plate of the host the fold still had a smooth surface and a regular rectangular form (Text-fig. 2*a*). The first changes occurred within a few hours. The surface became irregular in appearance, small grooves appearing in random

directions. This epibolic tendency was more pronounced in the apical than in the basal region of the fold. Moreover it regressed in the latter in the course of the next few hours, so that after about 18 hours three successive zones could be distinguished, viz. a proximal portion with smooth surface, a narrow transitional zone, and a distal portion with a very irregular surface. These zones appeared gradually without important changes in the total form of the implant. There were no indications of a displacement of cells inside the fold. The activation apparently proceeded from cell to cell in a proximo-distal direction, spreading over a certain distance (Text-fig. 2*b*).

During further development characteristic changes occurred. The whole fold shortened by a pronounced contraction of its basal region, which acquired a toadstool-shaped form. The transitional zone seemed to increase in size and the apical portion became more massive in appearance and only slightly grooved (Text-fig. 2*c*). During the following days the distinction between the various zones again became more evident, especially the irregular character of the apical region, which developed deep grooves and folds. The transitional zone spread over the entire proximal portion and grew together with the neural folds of the host (Text-fig. 2*d*). During further development the proximal and middle zones became more and more incorporated in the general contour of the host, forming only a somewhat irregular, hemispherical protuberance. The distal portion, however, acquired a more and more irregular character and finally disintegrated almost entirely.

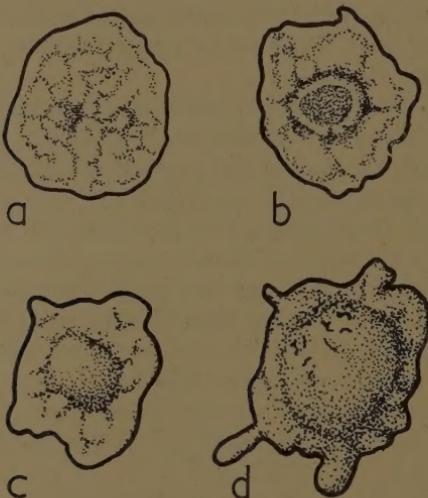
Histological examination showed that the proximal portion always represented neural material only, that the transitional region consisted of neural crest and epidermal material, while finally the distal region consisted of so-called atypical epidermal material, which did not differentiate. One actually gets the impression that the activating influence also spreads some distance into the presumptive epidermal portion of the fold, thus dividing this region into a more proximal zone upon which the activation exerts a certain influence and a distal zone of varying size—depending on the total length of the fold—which remains completely indifferent.

The external development of such folds pleads strongly in favour of a progressive action from the host penetrating the fold in a proximo-distal direction and leading to the formation of a series of successive zones with various differentiation tendencies.

EXTERNAL DEVELOPMENT OF SANDWICH EXPLANTS

The development of the explants is very much retarded in comparison with normal controls. During the first day the flat sandwich acquired an irregular surface with rather deep grooves and folds. The area around the implanted notochord did not behave markedly differently from the more peripheral zones. It was somewhat thickened. The edges of the explants soon became rather irregular. Even after 24 hours no particular activity was noticeable (Text-fig. 3*a*). Only

after 2 to 3 days did the induced neural plates—on both sides of the explants—become visible. The central area thickened and acquired a smooth surface, whereas the neural folds began to rise and formed a more or less circular wall around the inner neural plate. The form of the neural inductions was in general circular or somewhat ellipsoid. The two neural plates were mirror images



TEXT-FIG. 3. External development of ectodermal sandwich with notochord fragment mounted in between the two layers of ectoderm. *a*, 21 hours; *b*, ± 70 hours; *c*, ± 96 hours; and *d*, 11 days after good attachment of the two layers. Enlargement $\times 15-20$.

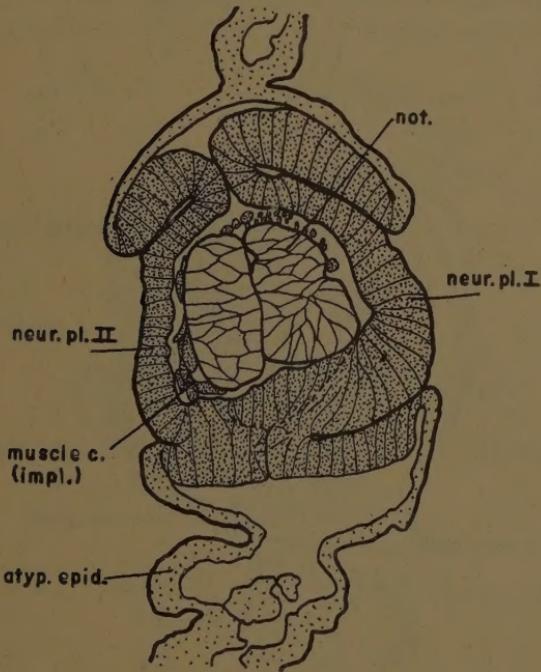
Around the neural induction a narrow zone of ectoderm could be distinguished which differed in its behaviour from the more peripheral material. The edges of the explants became more and more irregular in form and at some points small thickenings appeared (Text-fig. 3*b*). In the next 24 hours the neural plates gradually closed by overgrowth of the neural folds, giving the whole explant a discoidal form (Text-fig. 3*c*). During further development the central thickening increased markedly in size and became spherical. The outer portion of the explants became more and more irregular and formed small protrusions and globules. After 11 days the first chromatophores appeared underneath the epidermis of the spherical central portion which gradually increased in size. One got the impression that more and more cells of the outer epidermal region of the explant became incorporated in the epidermis covering the neural induction itself. In some cases the small thickenings along the edge of the explant grew out to form isolated vesicles, in other cases they remained small and compact (Text-fig. 3*d*).

In general the *Triturus* explants developed much more slowly than the axolotl

explants. All the axolotl explants showed closed neural formations after 4 days, whereas several *Triturus* explants still had partially open neural plates after 7 days or more.

INTERNAL DEVELOPMENT OF THE SANDWICH EXPLANTS

A few examples will demonstrate the characteristic development. Explant of *Triturus alpestris* No. XXVI still had two open neural plates at the time of fixation, 7 days after operation. A median transverse section shows that the neural folds and outer margins of the neural plate have only overgrown half of the



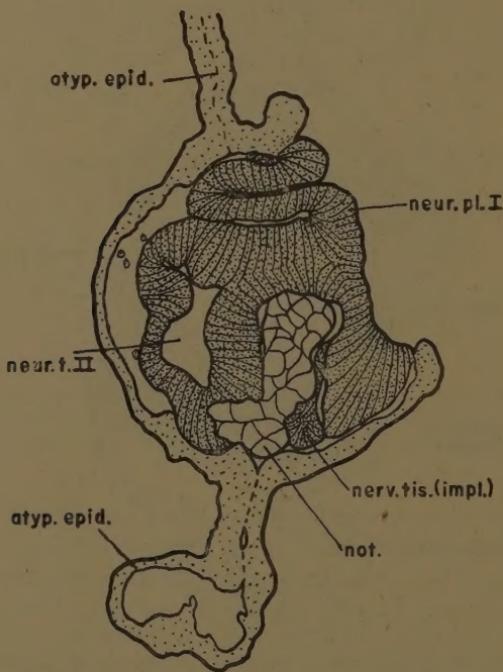
TEXT-FIG. 4. Transverse section through explant *Tr. alp.* XXVI, fixed 7 days after operation. The two neural plates (*neur. pl.*) are still half-open. The notochord (*not.*) is accompanied by a few muscle cells (*muscle c.*) and some small necrotic elements. Enlargement $\times 74$. *Atyp. epid.*: atypical epidermis.

original neural plate (Text-fig. 4). The mutual attachment of the two neural plates, which tend to close in opposite directions, apparently interfered with a normal closure and very much retarded the formation of neural vesicles.

As already mentioned, the outer margins of the neural plates had curled during the elevation of the neural folds and were growing in a centripetal direction. The outer margins of the neural plates were, therefore, originally situated—before curling and overgrowth began—at a rather great distance from the

centrally located notochord. The two neural plates were, moreover, firmly attached to each other, so that during development their more peripheral portions cannot have been in direct contact with the notochord. The neural plate while still flat must have had a diameter many times greater than that of the rather compact notochord, the more so since the notochord had begun to differentiate, which means a marked increase in size.

The explant of *Triturus alpestris* No. IX showed one closed neural vesicle and one almost open neural plate at the time of fixation. Both neural plates appeared at the same time after operation, so that the difference in behaviour of the two neural plates must be due to different mechanical conditions. Here the inductor



TEXT-FIG. 5. Transverse section through explant *Tr. alp.* IX, fixed 13 days after operation. One neural tube (*neur. t.*) has been formed and one neural plate is still open. The notochord is accompanied by some nervous tissue (*nerv. tis.*).

Further abbreviations as in Text-fig. 4. Enlargement $\times 74$.

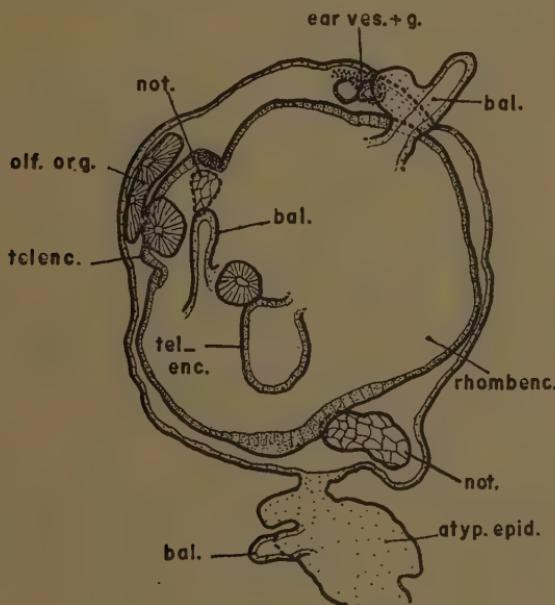
(a piece of notochord and some neural tissue) has an eccentric position in respect of the two neural formations (Text-fig. 5). This is a rather general phenomenon especially in those explants in which the neural plates apparently had great difficulties in closing. It must therefore be due to a secondary displacement during the closure of the neural plates. In this explant, which was 13 days old, the closure of one of the neural plates was definitely interfered with.

This explant showed, just as did the preceding one, that the neural plates must have been of much greater size than the inducing material and that the peripheral regions of the neural plates cannot have had any direct contact with the inductor during their development.

FINAL DIFFERENTIATION OF THE SANDWICH EXPLANTS

From the *Triturus* explants only one example will be described, viz. *Triturus alpestris* No. VII, aged 31 days.

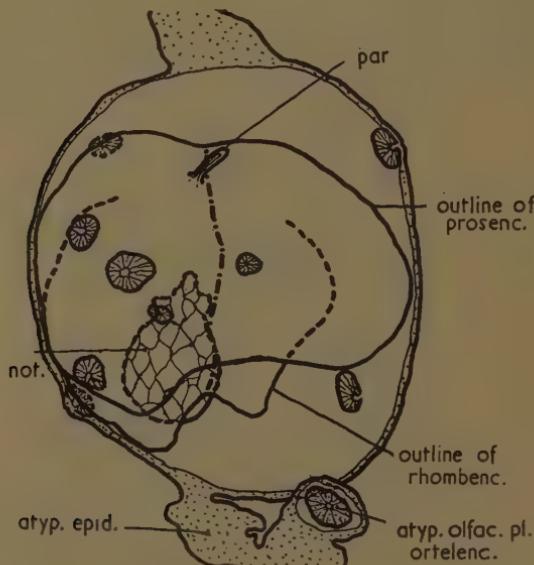
In this explant the neural formation is a single one, since one of the ectodermal layers which came from a gastrula with a horseshoe-shaped blastopore had apparently lost its competence. The inductor, consisting exclusively of notochord



TEXT-FIG. 6. Graphical reconstruction of explant *Tr. alp.* VII, fixed 31 days after operation. Projection of all structures on a transverse plane. Lower portion: rhombencephalon (*rhombenc.*) with ear vesicle and ganglia (*ear ves.+g.*) in contact with notochord (*not.*). Upper portion: prosencephalon with two distinct telencephalic protrusions (*telenc.*) with olfactory organs (*olf. org.*) and balancers (*bal.*). Enlargement $\times 48$.

tissue, has an eccentric position. The main piece of notochord is located near the flap of atypical epidermis, while a small fragment was located at some distance, although on the same side, of the neural vesicle. The graphical reconstruction, given in Text-fig. 6, shows the rather complicated structure of the single neural vesicle. Its lower portion—with respect to the plane of reconstruction—

has a more or less characteristic rhombencephalic character. Both pieces of notochord are in direct contact with this region, while at one side along the edge a rudimentary ear vesicle with ductus endolymphaticus and ganglia has differentiated. The upper half of the vesicle—in the graphical reconstruction directed towards the observer and, therefore, drawn in continuous lines—has a thinner wall. It shows two typical telencephalic protrusions accompanied by well-differentiated olfactory organs and balancers.

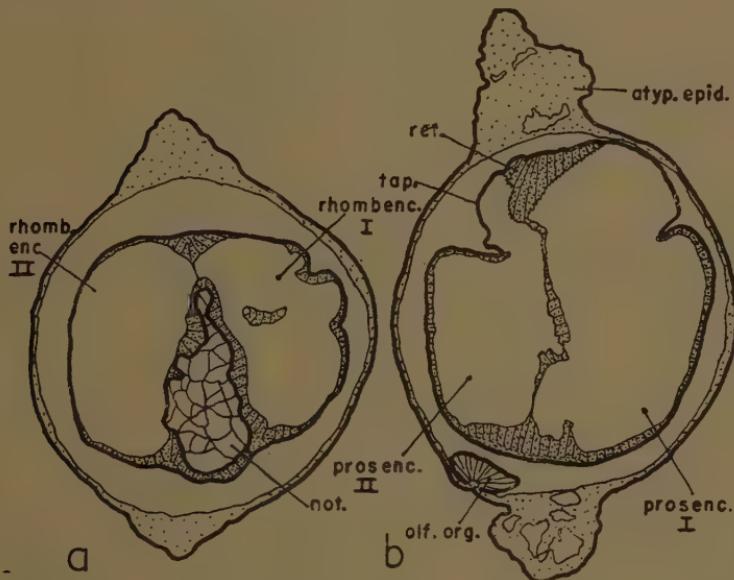


TEXT-FIG. 7. Graphical reconstruction of explant Axolotl E.4, fixed 13 days after operation. Projection on a transverse plane. Double neural formation, borderline indicated by interrupted-pointed line. Lower portion: rhombencephalon in direct contact with notochord. Upper portion: prosencephalon with paraphysis (*par*) and surrounded by many olfactory placodes. Isolated local activation along edge of explant as atypical olfactory placode or telencephalic cell-mass. Enlargement $\times 48$.

The axolotl explants showed in general a better and more rapid differentiation, so that more structures could be recognized at a younger age. Two characteristic examples will be briefly described.

Axolotl No. E.4, aged 13 days. The spherical central portion of the explant contains a neural vesicle, of which two different regions can clearly be distinguished. In the lower region—with respect to the plane of reconstruction—the notochordal tissue is embedded in neural material, which consists of two vesicles with a thick wall in contact with the notochord. The cellular arrangement and differentiation are typically rhombencephalic. The upper part of the

neural formation has a rather thin wall and consists of two swollen vesicles. These vesicles are in open communication with the two cavities of the lower rhombencephalic region. At the borderline of the two upper vesicles a parapysis has developed, while all around them, like the stars in the firmament, a large number of small but typical nasal organs have differentiated. The upper half therefore represents two prosencephalic vesicles. The vesicles are separated from each other by a thin wall indicated in the graphical reconstruction by the dash-and-dot line (Text-fig. 7).

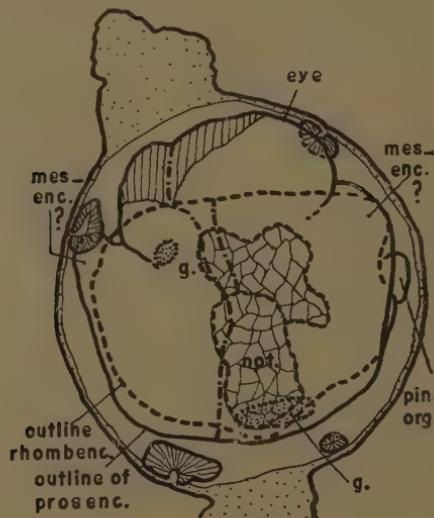


TEXT-FIG. 8. Two transverse sections through explant Axolotl E.1, fixed 14 days after operation. First section through lower, rhombencephalic level of double neural formation. Second section through upper, prosencephalic level with common rudimentary eye with retina (*ret.*) and tapetum (*tap.*).
Enlargement $\times 48$.

Along the edge of this explant a small thickening has developed consisting of a very small epithelial vesicle with a centrally-placed neuroid structure, representing an isolated atypical olfactory organ or a rudimentary telencephalic cell mass (Text-fig. 7, lower portion).

Axolotl No. E.1, aged 13 days. This explant showed, in general, a development similar to axolotl No. E.4. Its final differentiation also resembles closely that of the preceding case, but shows some interesting individual traits. The notochord is situated between the two rhombencephalic vesicles. They form the basic portion of the neural formation. The two vesicles are locally separated from each other only by a very thin partition-wall (Text-figs. 8a and 9). Some rhombencephalic ganglia have differentiated in their neighbourhood.

The upper portion consists of two prosencephalic vesicles with some characteristic prosencephalic structures, such as a pineal body; an eye, rudimentary in form but well differentiated histologically; and a number of nasal placodes (Text-fig. 8b). At the border of the rhombencephalic and the prosencephalic areas some small protrusions can be observed, each of which resembles the pars dorsalis of a mesencephalon (Text-fig. 9).

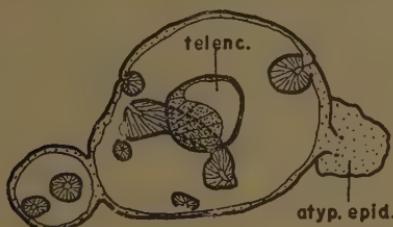


TEXT-FIG. 9. Graphic reconstruction of same explant as Text-fig. 8, Axolotl E.1. Projection of double neural formation on a transverse plane. Lower portion: rhombencephalon enclosing the notochord and accompanied by some ganglia (g.). Upper portion: prosencephalon with rudimentary eye, pineal body and several olfactory placodes. Some protrusions of mesencephalic character (*mesenc.?*) at intermediate level. Enlargement $\times 48$.

The partition between the two prosencephalic vesicles, which were—as in the preceding cases—in wide-open communication with the cavities of the corresponding rhombencephalic parts, was parallel with the original plane of the flat explant and divided the single eye rudiment into two parts. An interesting fact is that this eye has been built up from material of both the neural plates which has been incorporated into one single eye-cup with common retinal and tapetum layers (Text-figs. 8b and 9).

As already mentioned in the description of explant No. E.4, some isolated formations of neural or placodal character developed along the edges of several axolotl explants. In explant No. E.7 in which ectoderm of a somewhat older gastrula was used, leading in general to the formation of smaller activations, a very characteristic neural formation developed at one side along the edge of the

explant. It apparently consists of two separate parts. The bigger one, which has the external appearance of a small epithelial vesicle, contains a rudimentary but characteristic telencephalon embedded in very loose mesenchyme around which



TEXT-FIG. 10. Graphic reconstruction of two small local activations along edge of explant Axolotl E.7, one consisting of small telencephalon surrounded by a number of olfactory organs, the other representing only 2 isolated olfactory organs. Projection on a transverse plane. Enlargement $\times 48$.

a number of nasal placodes of varying size have differentiated. The smaller one consists of a very small epithelial vesicle with some connective tissue in which two nasal placodes are located, appearing as small invaginations of the epithelial wall (Text-fig. 10).

DISCUSSION

These experiments have a purely qualitative character. The experimental material comprises only about one and a half dozen *Triturus* explants and half a dozen axolotl explants. Their development is, however, so characteristic and so constant that the questions put forward in the introduction can be partially answered.

The third question may be taken first. Does the notochord induce a neural field in the overlying ectoderm which spreads with decrement in all directions, or can it only be made responsible for the induction of neural tissue in its direct vicinity, while the more lateral portions of the neural plate are induced by the more lateral underlying parts of the archenteron roof?

The development of folds of competent ectoderm attached to the neural plate of a host embryo strongly suggests that activation spreads from cell to cell in the attached fold in a proximo-distal direction. Only cells of the most basal portion of the fold can come into direct contact with the notochord; the more apical regions never do so but remain at a considerable distance from any host tissue (neural plate or archenteron roof). Nevertheless rather apical regions of the implanted fold were reached by the activation.

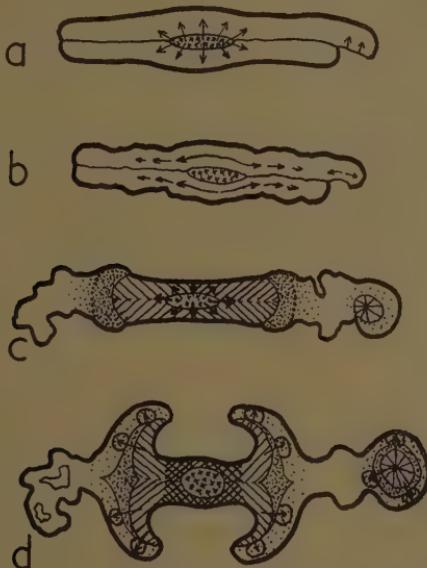
The constant development of successive zones, viz. neural, mesectodermal, activated epidermal and indifferent epidermal, suggests moreover that the activation actually spreads with *decrement* as is to be expected from a field action (Dalcq & Pasteels, 1937; Nieuwkoop, 1950).

In the sandwich explants the situation is almost identical with the exception that the activation does not spread in one direction only, but can equally spread in all directions in the flat epidermal layers. Here again the activation spreads over an area which is several times larger than the inductor system itself. The extension of the activation with *decrement* finds here its expression in the concentric structure of the neural activation in which again the same four successive zones can be distinguished: a central neural zone, a narrow mesectodermal and an activated epidermal ring, and an indifferent epidermal zone. We may therefore conclude that *neural activation actually has the character of a field action*.

The neural plates formed are, however, smaller than those of control embryos at the corresponding cranio-caudal level. In many cases a single piece of notochord has induced two neural plates, one on each side of it, which might partially account for their smaller size. On the other hand, there is good evidence that the lateral portions of the archenteron actually support neural induction (Raven & Kloos, 1945). We must, however, realize that we can only speak of actual support of the neural activation by more lateral portions of the archenteron roof when the activating influence which the lateral portions can exert when acting alone would be *stronger* than the activation obtained by the neural field spread from the dorsal midline. We know from several investigations (Damas, 1947; Gallera, 1947, &c.) that implantation in a so-called neutral environment leads to an interference with the normal differentiation tendencies of the material implanted, especially when the implants are small, so that essentially we must speak of an inhibitive effect of such a 'neutral' environment. An exchange between both areas—implant and environment—apparently takes place until a new, but lower, equilibrium (continuous field) has been established. Consequently parts of the archenteron roof exerting only low inductive actions which in themselves would not lead to the level of activation already achieved in the overlying ectoderm at these points would actually exert an inhibitive instead of a supporting action upon the overlying neural field. The influence of the lateral portions of the archenteron roof has, therefore, probably more the character of a double assurance.

The spreading of the neural field with decrement can perhaps be understood by assuming an equilibrium relationship between two counteracting principles. On the one hand, ectoderm not activated gradually develops stronger and stronger epidermal differentiation tendencies leading to the formation of a characteristic epidermal epithelium if a substrate is available. On the other hand, activation tends to shift development into an aberrant direction leading to the appearance of neural differentiation tendencies. The spatial interaction between gradually increasing epidermal differentiation tendencies in the entire ectoderm and an activating action emanating from a certain point or spot inside this area must gradually lead to a spatial segregation of the two alternative directions of differentiation. Varying mutual proportions exist spatially in this interaction of the two divergent principles, leading to different cellular differentiations. This

suggestion, which is at present at the biological level, can, in our opinion, just as well be brought to a biochemical level in terms of, e.g., competition of enzyme



TEXT-FIG. 11. Diagrammatic sketch of activation and transformation relations in transverse sections of sandwich explant of competent ectoderm with a fragment of notochord as inductor at four successive phases of development. *a*. Primary inductive action from notochord material and activative effect of external medium upon still exposed inner surface of edge of upper ectodermal layer. *b*. Spreading with decrement of neural activation field in ectodermal layers from centre (in direct contact with notochord) towards periphery of explant. Similar situation around local activation along edge of explant. *c*. Formation of areas with different differentiation tendencies. Central neural area (obliquely hatched). Concentric mesectodermal, and activated epidermal zones (respectively densely and sparsely dotted). Peripheral zone of indifferent epidermal character. Neural mesectodermal and activated epidermal zones first with 'prosencephalic' differentiation tendencies. Secondary, transformative inductive action emanating from notochordal material. *d*. Elevation of neural folds and curling of (peripheral) edges of neural plates. Formation of rhombencephalic differentiation tendencies in direct vicinity of notochord and development in prosencephalic direction of more peripheral portions of activated area of explant, with local secondary inductions in enveloping epidermal layer. Similar relations in the local activation along edge of explant, in which transformative influences are, however, absent.

systems. Crucial experiments are, however, needed in order to get some insight into the processes involved and their actual relationships.

The final differentiation of the explants is very characteristic: there is always a rhombencephalic part in direct contact with the notochord and a prosencephalic part located at the side(s) opposite the notochord. In some cases intermediate

mesencephalic structures can be recognized. Considering the closure of the neural plate or plates, it becomes clear that the central portions of the neural plate(s) develop into the rhombencephalic structures, whereas the peripheral regions give rise to the prosencephalic brain parts. The still more peripheral neural crest zone disperses between the neural formation and the enveloping epidermis and forms connective tissue, chromatophores and ganglia depending on its contact with the different brain parts. The still more peripheral zone of epidermis which has nevertheless been reached by the spreading activation forms the enveloping epidermis of the neural formation. Out of this epidermis a large number of olfactory organs differentiated, olfactory organs which were not always in contact with telencephalic hemispheres. In other cases ear vesicles developed. The most peripheral zone of the explant did not differentiate into typical epidermis for lack of substrate, but degenerated gradually.

In the diagrammatic sketch of Text-fig. 11 the supposed course of events is indicated.

Text-fig. 11a represents the primary inductive influence emanating from the notochordal tissue and leading to an activation in the overlying ectoderm (Text-fig. 11b). This activation spreads as a field-action in all directions with decrement and gives rise to various concentric zones of differentiation, viz. a neural, a mesectodermal, an activated epidermal, and an indifferent epidermal zone (Text-fig. 11c). The activated material automatically follows a prosencephalic direction of differentiation. Simultaneously, further inductive influences emanate from the notochordal tissue transforming the prosencephalic differentiation tendencies of the activated material into rhombencephalic ones. This transforming action is apparently restricted to the neural material found in the direct vicinity of the notochord.

Before answering the further questions put forward in the introduction the small isolated activations which developed locally along the edge of the axolotl explants require our attention. The localization of such an activation always coincided with a point along the edge of the explants where, after mounting, the two ectodermal layers did not exactly fit each other, so that, during the early hours, at least the inner surface of one of the layers was exposed to the external medium. This apparently led to a weak local activation of the ectoderm. In some cases only an olfactory organ differentiated (Axolotl Nos. E.4 and E.7); in other cases neural structures also developed and these were always prosencephalic. Thus Axolotl No. E.7 formed a characteristic rudimentary telencephalon surrounded by a large number of nasal placodes, while Axolotl No. E.5 (not described) formed both tel- and diencephalic structures. These local activations never developed in *Triturus*, where local exposures to the external medium occurred just as in axolotl. The external medium was either more toxic to the axolotl explants than to those of *Triturus* or the level of activation was more easily reached in competent axolotl ectoderm than it was in *Triturus*.

We can conclude from these experiments that actions leading to both activa-

tion and transformation *emanate from the notochordal material itself*. Under these conditions the activation spreads over a much wider area than the transformation. This might be correlated with the nature of both inducing influences of the archenteron roof, as has been suggested by Toivonen (1950) and others, but might just as well be due merely to quantitative differences between the two influences. This remains to be analysed still further before a reliable decision can be made.

The way in which the activation spreads is still completely obscure. Several possibilities exist, such as: (1) the activation actually spreads from cell to cell as an infectious disease spreads from one individual to the other; (2) substances diffuse through the tissue, so that a diffusion gradient is formed; (3) physico-chemical changes spread over the cell surface, indirectly affecting the cell metabolism. Although a diffusion of chemical substances (Toivonen, 1950) is the simplest assumption, there are no indications at all that it actually occurs.

In normal development the transverse strip of the neural plate at a level with the extirpated notochordal fragment differentiates entirely into rhombencephalon. In the explants, however, the notochord only transforms the central part of the induced neural formation. This suggests that the more lateral portions of the archenteron roof actually support the transformative action of the notochord, perhaps even more strongly than they support the activation at this level. Further experiments not only of a qualitative but also of a quantitative character are needed to give us an insight into the spatial configuration of both activities of the archenteron roof. The similar size and character of the various axolotl explants suggests that they could readily be used for quantitative studies, and further experiments have been planned to analyse quantitatively the influences leading to activation and transformation exerted by the various regions of the archenteron roof.

There is reason to assume that *the lowest step of activation of the ectoderm is still epidermal*, giving this ectoderm strong differentiation tendencies to form head epidermis and anterior head placodes such as olfactory placodes, lenses, and balancers. This means that these structures can actually be considered as realizations of weak prosencephalic differentiation tendencies which simply did not reach the level of activation for neural crest or neural material. The criticism of the work of Toivonen in which he grouped these epidermal differentiations under archencephalic inductions is, therefore, in my opinion, incorrect, although it is true that these structures normally develop at later stages of development as so-called secondary inductions. They can apparently develop just as well as direct consequences of the primary activation. The same holds for ear vesicles and ganglion placodes which normally accompany the rhombencephalon. There is good reason to assume that they can also develop without corresponding brain parts, although they apparently need neural crest material for their differentiation. While not excluding the possibility of a secondary induction by neural crest derivatives, it seems reasonable to suggest that *all the head placodes which*

normally develop more or less in rows at some distance from the borderline of the neural plate have a common origin and are all evoked by a very weak activative influence in the ectodermal layer combined with local secondary inductive actions (leading to activative and/or transformative effects) from the underlying archenteron roof and/or adjacent neural structures.

These experiments confront us again with the highly interesting but almost completely obscure problem of the local differentiation of certain structures. Why does a telencephalic hemisphere or an eye differentiate at a certain point in a certain explant, whereas in other, similar explants other structures manifest themselves? Differentiation tendencies towards all these different structures must be present in the neural material, but not all of them are able to realize themselves. The development of a common eye out of two opposed neural plates indicates that competition phenomena may play an important role in this segregation process. Once a centre is formed the surrounding material is incorporated and assimilated in the organ system until an equilibrium with other material-attracting centres has been established (cf. Lehmann, 1950). A very careful and thorough analysis is, however, needed to give us some insight into this fundamental process of organization.

SUMMARY

1. The inductive influence of presumptive notochordal tissue (neurula stage) upon competent ectoderm was tested in sandwich-experiments, for which eggs of *Triturus alpestris*, *T. taeniatus*, and *Ambystoma mexicanum* were used.
2. Strong activating and rather weak transforming influences emanate from the anterior portion of the notochord.
3. Both activating and transforming influences have the character of field actions and spread with decrement, probably from cell to cell, in the overlying ectoderm. Both influences, but especially the activation, can spread over an area much larger than the area in which a direct contact between inductor and ectoderm occurs. It is therefore suggested that the more lateral portions of the archenteron roof merely support the activation spread from the dorsal midline, probably as a form of double assurance.
4. The activation leads to a segregation into neural, mesectodermal, activated epidermal, and indifferent epidermal zones, each of which is characterized by a certain threshold value.
5. In the activated epidermal zone differentiation tendencies for prosencephalic placodal development arise. They can be transformed by additional transforming influences into those for rhombencephalic or spinal placodes.

REFERENCES

- DAMAS, H. (1947). Effet de la suspension précoce du flux inducteur sur la détermination du neurectoblaste médullaire. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **58**, 15–57.
- DALCQ, A., & PASTEELS, J. (1937). Une conception nouvelle des bases physiologiques de la morphogénèse. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **48**, 669–710.
- EVAL-GILADI, H. (1954). Dynamic aspects of neural induction in Amphibia. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **65**, 180–259.
- GALLERA, J. (1947). Effets de la suspension précoce de l'induction normale sur la partie préchorale de la plaque neurale chez les Amphibiens. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **58**, 221–64.
- (1948). Recherches comparées sur le développement du neurectoblaste préchordal transplanté sur l'embryon ou enrobé dans l'ectoblaste 'in vitro' ('Triton alpestris'). *Rev. suisse Zool.* **55**, 295–303.
- HOLTFRETER, J. (1947). Neural induction in explants which have passed through a sublethal cytolysis. *J. exp. Zool.* **106**, 197–222.
- LEHMANN, F. E. (1950). Die Morphogenese in ihrer Abhängigkeit von elementaren biologischen Konstituenten des Plasmas. *Rev. suisse Zool.* **57**, suppl. 1, 141–52.
- NIEUWKOOP, P. D. (1950). Neural competence and neural fields. *Rev. suisse Zool.* **57**, suppl. 1, 23–40.
- and others (1952). Activation and organization of the central nervous system in Amphibians. Parts I–III. I. Induction and activation. II. Differentiation and organization. III. Synthesis of a new working hypothesis. *J. exp. Zool.* **120**, 1–108.
- RAVEN, CHR. P., & KLOOS, J. (1945). Induction by medial and lateral pieces of the archenteron roof, with special reference to the determination of the neural crest. *Acta neerl. Morph.* **5**, 348–62.
- TOIVONEN, S. (1950). Stoffliche Induktoren. *Rev. suisse Zool.* **57**, suppl. 1, 41–56.

See for extensive references to literature: *Rev. suisse Zool.* **57**, suppl. 1.

(Manuscript received 15:iii:54)

Analyse de l'induction neurale chez les Amphibiens au moyen d'organisateurs marqués

par ADRIENNE FICQ¹

Chargée de Recherches au Fonds National de la Recherche Scientifique

Laboratoire de Morphologie animale, Université libre de Bruxelles

AVEC DEUX PLANCHES

INTRODUCTION

DES expériences de Brachet (1949) ont montré, de manière indirecte, que l'induction neurale semble s'accompagner d'une migration de granules colorables vitalement au rouge neutre; ils passeraient du chordoblaste dans le neuroblaste et leur migration serait arrêtée par l'interposition d'une lamelle de cellophane.

Il nous a paru intéressant de reprendre ces expériences, en utilisant la méthode autoradiographique pour la mise en évidence d'une éventuelle diffusion des macromolécules marquées, de l'organisateur vers l'ectoderme; cette technique a le gros avantage de donner des renseignements sur les constituants naturels de l'embryon; ils ne peuvent être fournis lorsqu'on utilise des colorants vitaux nécessairement toxiques.

Nous avons employé la technique des émulsions nucléaires parce qu'elle permet une localisation précise et une estimation quantitative de l'isotope, tant dans le greffon que dans l'hôte.

En marquant par la glycine-l-¹⁴C et par l'acide orotique-2-¹⁴C des organisateurs de Batraciens, nous avons essayé de suivre le sort des protéines et des acides nucléiques de l'implantat: ces substances sont, en effet, des précurseurs des protéines et des acides nucléiques.

Nous avons essayé de voir si, sous cette forme complexe, la radioactivité décelée au niveau du greffon se retrouve dans les autres territoires de l'embryon et si elle s'y distribue suivant des modalités précises.

Les expériences ont donc eu pour but de suivre, pour la première fois, le sort d'un organisateur marqué, non par un colorant, mais par un constituant normal des cellules.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

(a) *Essais préliminaires et description de la méthode*

Une expérience préliminaire a eu pour objet de suivre l'incorporation de la

¹ Author's address: Laboratoire de Morphologie animale. Université libre de Bruxelles. 1850 Chaussée de Wavre, Bruxelles, Belgium.

glycine- ^{14}C dans des embryons de Batraciens aux différents stades de leur développement. Nos observations ont porté sur deux espèces différentes: *Rana fusca* et le Pleurodèle (*Pleurodeles watsonii*) aux stades suivants: œufs indivis, blastulas, gastrulas et neurulas (stades 1, 8, 11, et 16 de Shumway).

Les embryons dégangués dans du Holtfreter stérile ont séjourné, pendant 3 heures, dans un milieu radioactif constitué de 5 c.c. de Holtfreter normal, stérile, additionné de glycocolle- ^{14}C à la concentration de 0.5 $\mu\text{M}.$ /c.c. (d'une activité de 450,000 c./minute/c.c.).

Un lavage dans du Holtfreter stérile contenant du glycocolle non marqué a été suivi de 2 lavages soigneux dans du Holtfreter pur.

Les embryons ont alors été fixés pendant 1 heure dans un mélange d'alcool et d'acide acétique (3 : 1), puis lavés à l'alcool à 70°, enrobés à la paraffine et coupés à 10 μ sur des lames gélatinées.

Les coupes ont été recouvertes d'émulsion photographique suivant la technique décrite en détails dans un autre travail (Ficq, 1954). Après 5 jours d'exposition, les préparations ont été développées, fixées, lavées, et séchées.

L'examen microscopique a montré que la pénétration du glycocolle s'effectue mal dans les embryons entiers, ce qui confirme les observations que Friedberg & Eakin (1949), ainsi que Brachet & Brygier (1953) ont faites par d'autres méthodes; en conséquence, les expériences ultérieures ont été exécutées sur des fragments d'embryons où une incorporation appréciable peut être obtenue.

A la suite de ces essais préliminaires, nous avons traité des organisateurs isolés de Pleurodèles par la solution radioactive; après des lavages répétés, les fragments ont été implantés dans le blastocèle de gastrulas appartenant à la même espèce (Pleurodèles). Nous avons observé une pénétration massive du glycocolle dans l'explantat de la lèvre dorsale du blastopore. Les embryons greffés ont fourni de bonnes réponses morphogénétiques sous la forme d'inductions importantes, malgré la forte radioactivité du greffon. Celle-ci se retrouvait facilement par la méthode autoradiographique; en outre, il est apparu nettement que le système nerveux induit manifestait une radioactivité appréciable.

(b) Greffes hétéroplastiques

1. Détails techniques

Ces essais préliminaires ayant montré que l'expérience était techniquement possible, nous avons cherché à rendre la démonstration plus convaincante en travaillant sur des greffons et des hôtes d'espèces différentes, donc aisément reconnaissables. Les images autoradiographiques obtenues lors de ces expériences étant de loin les plus nettes, il importe de s'étendre un peu plus sur les détails expérimentaux de cette partie du travail.

(a) *Greffes d'organisateurs de Rana fusca, marqués par la glycine- ^{14}C dans des gastrulas d'Axolotl.* Des lèvres dorsales du blastopore de gastrulas de *Rana fusca* ont été disséquées et prélevées stérilement dans 5 c.c. d'une solution ainsi composée:

Holtfreter normal (stérile)	1 litre
Elkosine (Ciba)	5 c.c. (1 ampoule)
Streptomycine	40 γ
Pénicilline	4 unités Oxford/c.c.
La solution a été ajustée à pH 7	

Les explantats, prélevés délicatement à la pipette, ont été placés pendant 3 heures dans 5 c.c. de la même solution, mais additionnée de $0.5 \mu\text{M}./\text{c.c.}$ de glycine- $1-^{14}\text{C}$, dont toutes les molécules étaient marquées.

L'incubation a été suivie d'un lavage soigneux, à 3 reprises, dans le même milieu contenant, cette fois, du glycocolle non radioactif.

La greffe des organisateurs marqués de *Rana* a été effectuée dans le blastocèle de jeunes gastrulas d'Axolotl; les précautions usuelles d'asepsie ont été observées rigoureusement.

Une heure après l'opération, le milieu stérile concentré a été remplacé par le même milieu, dilué au dixième.

Les embryons opérés ont été maintenus à 18° pendant 2 ou 3 jours, puis fixés à l'alcool acétique (3 : 1) pendant 1 heure. Après lavage à l'alcool 70° , ils ont été enrobés et coupés à 10μ d'épaisseur sur des lames gélatinées.

Les coupes ont alors été recouvertes d'émulsion photographique (G, Ilford 'in gel form') suivant la technique habituelle.

Après 3 à 6 jours d'exposition en chambre noire, les préparations ont été développées, fixées et colorées à travers la gélatine par la méthode de Unna.

Pour distinguer la radioactivité de la glycine incorporée respectivement par les protéines et par les acides nucléiques, une série de coupes alternantes ont été hydrolysées par de l'HCl normal pendant 5 minutes à 60° , suivant la méthode de Vendrely (1946).

Enfin, pour éliminer plus spécifiquement l'activité imputable à l'acide ribonucléique, une autre série de coupes a été traitée à la ribonucléase selon la méthode de Brachet (1942).

L'existence possible, dans les préparations de ribonucléase cristallisée, d'enzymes protéolytiques qui pourraient rendre cette réaction cytochimique moins spécifique et attaquer la gélatine de l'émulsion photographique, nous a conduite à la purifier selon la méthode de MacDonald (1948): 5 c.c. d'une solution à 1.25 pour cent de ribonucléase, cristallisée selon la méthode de Kunitz (1950), dans du sulfate d'ammonium (1/5 de la saturation) ont été ajustés à pH 3.0 avec de l'acide sulfurique N. Après avoir été portée à l'ébullition au bain-marie, pendant 5 minutes, la solution a été brusquement refroidie et maintenue à -5° C . pendant 1 heure. Le précipité a été éliminé par une centrifugation brève et la solution a été mise à dialyser contre de l'eau courante pendant 5 heures.

Un tel traitement inhibe complètement l'activité protéolytique et il laisse à la ribonucléase une activité enzymatique de 92 pour cent.

L'incubation des lames dans la solution de ribonucléase ainsi purifiée a été effectuée pendant 1 heure à 37° . À ce moment, les lames ont été lavées soigneuse-

ment dans de l'eau distillée, de même d'ailleurs que celles qui avaient été soumises à l'hydrolyse acide; elles ont été ensuite recouvertes d'émulsion photographique.

Enfin, afin de s'assurer que la technique opératoire n'altère pas le pourcentage et la qualité des inductions, quelques implantations d'organisateurs dans des embryons témoins ont été effectuées; dans ces témoins, le traitement à la glycine radioactive était remplacé par un traitement à la glycine non marquée.

(β) *Greffes d'organisateurs de Rana fusca, marqués par l'acide orotique-2-¹⁴C-6 carboxylique, dans des gastrulas d'Axolotl.* Une autre série d'expériences a été effectuée sur le même matériel et dans des conditions analogues; mais l'organisateur a été marqué, cette fois, par de l'acide orotique-2-¹⁴C dont l'activité spécifique était de 40,000 c./minute/mgr. On sait que cette substance est un précurseur très spécifique de l'acide ribonucléique (Hurlbert & Potter, 1952).

Comme on est malheureusement limité par la faible solubilité de cette substance (elle n'est que de 50γ/c.c.) l'activité totale du milieu n'était que de 20,000 c./minute, au lieu de 450,000 dans l'expérience précédente.

Le milieu d'incubation a été naturellement ajusté à pH 7.0 après addition de l'acide orotique.

Les durées de traitement par l'acide orotique marqué, les lavages et tous les détails techniques ultérieurs étaient les mêmes que dans l'expérience précédente.

Dans ce cas encore, une série de coupes alternantes a été soumise à l'action de la ribonucléase, dans les mêmes conditions que lors de l'expérience ci-dessus.

Enfin, les témoins ont consisté en l'implantation, dans des gastrulas d'Axolotl, d'organisateurs de *Rana fusca* traités par une solution d'acide orotique non marqué.

(γ) *Expériences d'explantation.* Des organisateurs d'Axolotl, qui avaient été prélevés et traités exactement comme dans les expériences précédentes, ont été marqués par de la glycine-1-¹⁴C, puis accolés à de l'ectoblaste, soit d'Axolotl, soit de *Rana temporaria*.

Toutes les précautions décrites plus haut ont été observées à nouveau pour garantir la stérilité des opérations et pour empêcher toute contamination par l'élément radioactif.

Dans une seconde série d'expériences, de l'ectoblaste de *Rana temporaria* marqué à la glycine-1-¹⁴C a été accolé à des organisateurs normaux d'Axolotl non marqués.

Enfin, des témoins ont été effectués en utilisant de la glycine non radioactive pour les deux séries d'expériences.

A titre de contrôle biochimique, des explantats préalablement bouillis ont été traités par la solution radioactive dans les mêmes conditions que les explantats vivants; ils ont été ensuite fixés, coupés et recouverts d'émulsion photographique afin de vérifier si la radioactivité observée ne pouvait être due, en partie, à des phénomènes d'adsorption.

2. Résultat des expériences

(a) Les organisateurs qui ont été marqués par de la glycine- ^{14}C , puis implantés dans des blastulas, montrent sur coupes une radioactivité intense du greffon.

Dans les cas positifs (50 pour cent), une activité appréciable se manifeste aussi dans le *système nerveux induit* et dans la chorde, quand celle-ci s'est différenciée; cette activité est très nettement localisée dans les noyaux (Planche 1, fig. A). Une activité moindre s'observe aussi dans le système nerveux primaire; en général, on retrouve des traces d'électrons dans toutes les régions de l'embryon où la morphogénèse est active (Planche 2, fig. C).

Dans les cas où le greffon s'est autodifférencié, il présente une activité intense, dans la chorde notamment.

Dans les coupes hydrolysées par l'HCl pendant 5 minutes à 60° , une diminution de la radioactivité, qui atteint 50 pour cent de la valeur initiale, s'observe tant dans le greffon que dans les organes en voie de formation.

Enfin, l'autoradiographie des préparations traitées à la ribonucléase accuse une diminution de 32 pour cent des traces.

On peut en conclure que, lors de l'hydrolyse par l'HCl, 18 pour cent des traces éliminées proviennent des bases puriques de l'acide désoxyribonucléique et, peut-être, d'une petite fraction protéique. Ce résultat se retrouve aisément lorsqu'on traite les coupes par la ribonucléase d'abord, puis par l'HCl N à 60° , pendant 5 minutes.

L'observation des coupes des embryons témoins a montré que le pourcentage des inductions est voisin de celui qu'on obtient dans les expériences faites avec les organisateurs marqués. L'étude de ces témoins permet, en plus, de déterminer la valeur du back-ground, qui a été déduite dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Répartition de la radioactivité dans les différents régions d'embryons présentant une induction

<i>8 embryons</i>	<i>Nombre de traces</i>			
	<i>%</i>	<i>Greffon</i>	<i>Syst. nerv. ind.</i>	<i>Syst. nerv. prim.</i>
Radioactivité initiale	100	500	68	42
Radioactivité après hydrolyse HCl	50	248	31	22
Radioactivité après ribonucléase	68	340	45	27

Ces chiffres sont tirés de l'observation des coupes de 8 embryons, qui présentaient tous de belles inductions. Le nombre total des traces comptées est, malheureusement, insuffisant pour donner au résultat une réelle valeur statistique; il ne fait cependant pas de doute que le phénomène observé soit significatif.

Il nous a été malheureusement impossible de calculer la radioactivité spécifique des protéines et des acides nucléiques, en raison de la complexité excessive du matériel.

(β) Dans le cas des organisateurs marqués par l'acide orotique, l'incorporation dans le greffon est sensiblement moindre que dans celui de la glycine; mais une nette radioactivité se retrouve à nouveau dans toutes les régions où la morphogénèse est active; les noyaux sont particulièrement actifs et on y remarque assez souvent des traces émises par les nucléoles. Quelques électrons épars s'observent cependant entre les plaquettes vitellines (Planche 2, fig. D).

Lorsque des coupes de cette série sont soumises à l'action de la ribonucléase, elles présentent une radioactivité du même ordre de grandeur que le back-ground: l'incorporation, dans ce cas, se produit donc *spécifiquement dans l'acide ribonucléique*.

L'observation des coupes d'embryons témoins conduit aux mêmes conclusions que dans le cas de la glycine; l'incubation dans le milieu marqué par l'acide orotique ne semble pas inhiber sensiblement le pouvoir inducteur de l'organisateur. C'est l'observation des coupes de cette série qui nous a permis, à nouveau, de mesurer le back-ground.

(γ) Dans le cas des explantats soumis à l'action de la glycine radioactive, on observe à nouveau une forte radioactivité dans les noyaux du fragment traité; on note, en outre, une diffusion modérée de la glycine vers l'ectoblaste ou le neuroblaste accolés (Planche 1, fig. B).

Toutefois, nous n'avons pas obtenu, dans ces conditions, de réponses morphologiques nettes, même dans le cas des témoins où l'explantat n'était pas radioactif.

Les coupes traitées à la ribonucléase et à l'HCl N à 60° pendant 5 minutes ont montré des diminutions d'activité dans les explantats analogues à celles qui ont été observées dans le cas des embryons entiers.

Enfin, il semble que l'acide orotique et la glycine libres soient totalement éliminés des greffons par les lavages effectués avec ces substances non marquées et par la fixation: en effet, des fragments bouillis, qui ont été traités de la même manière que les embryons en expérience, ne présentent qu'une radioactivité tout à fait négligeable, conformément d'ailleurs aux résultats de Friedberg & Eakin (1949).

DISCUSSION

L'analyse par autoradiographie des greffes d'organisateurs marqués confirme les résultats que Brachet (1949) avait obtenus en étudiant la migration de granules colorés au rouge neutre au cours de l'induction; elle est en accord aussi avec les données de MacKeehan (1951) et de De Vincentiis (1952) qui ont pu empêcher l'induction du cristallin en l'isolant de la cupule optique par des membranes de porosités variables; elle cadre, enfin, avec les résultats plus anciens de Holtfreter (1948) qui a montré qu'un organisateur enveloppé dans une mem-

brane vitelline est incapable d'induire et de Brachet (1950) qui a obtenu des effets comparables en interposant une membrane en cellophane entre l'organisateur et le réacteur.

L'autoradiographie présente un net avantage sur la coloration vitale, puisqu'elle permet de suivre les constituants naturels de l'organisateur (protéines, acides nucléiques) au lieu d'un colorant basique, qui risque d'être toxique; elle se montre aussi, croyons-nous, plus favorable que les mesures au compteur de Geiger auxquelles Waddington (1950) a recouru: en effet, afin d'obtenir une activité mesurable et d'arriver à séparer le greffon de l'ectoblaste, Waddington a dû utiliser, comme implantat, une suspension de levures traitées par du ^{32}P , puis tuées. La technique autoradiographique permet, au contraire, de travailler sur l'organisateur *vivant*. Comme l'a souligné Brachet (1945), le mécanisme biochimique des évocations provoquées par des inducteurs hétérogènes (les levures tuées de Waddington, par exemple) n'est pas nécessairement le même que celui de l'induction normale.

Le glycocolle et l'acide orotique libres étant vraisemblablement éliminés lors du lavage, de la fixation et de l'enrobage, on peut attribuer la radioactivité observée dans les autoradiographies à des substances de poids moléculaire élevé, qu'il s'agisse d'acides nucléiques ou de protéines. Il se pourrait dès lors que l'organisateur laisse diffuser de telles substances dans les organes qu'il induit; mais il importe cependant de noter que la radioactivité ne se retrouve pas exclusivement dans ces derniers, puisque les organes axiaux de l'hôte sont, quoiqu'à un degré moindre, actifs aussi. On ne peut exclure la possibilité que cette activité résulte d'une destruction de certaines cellules du greffon, avec libération d'acides aminés ou de pyrimidines, qui diffuseraient dans la totalité de l'hôte et y seraient reincorporés dans les régions où la morphogénèse est la plus active.

Des expériences récentes de Niu & Twitty (1953) et de Grobstein (1953) semblent montrer d'ailleurs que certaines inductions peuvent se produire sans qu'il y ait de contact direct entre le chordomésoblaste et l'ectoblaste.

Il nous reste à examiner sommairement quelle est la nature chimique des molécules actives et à discuter leur localisation intracellulaire.

En ce qui concerne les embryons traités par l'acide orotique, nous avons vu qu'un traitement par la ribonucléase réduit l'activité au niveau du back-ground, la radioactivité observée est donc le fait du seul acide ribonucléique; il en est ainsi tant dans le cytoplasme que dans le noyau; c'est dans ce dernier que la radioactivité est la plus élevée, en raison sans doute d'un métabolisme particulièrement actif des nucléoles. Ces données cadrent parfaitement avec celles que Hurlbert & Potter (1952) ont obtenues dans le cas du foie de Mammifères: pour ces auteurs aussi, l'acide orotique serait un précurseur hautement spécifique de l'ARN et le noyau se montrerait beaucoup plus actif que le cytoplasme.

L'interprétation des expériences faites avec de la glycine marquée est beaucoup plus complexe: nous avons vu qu'une hydrolyse par l'HCl N, pendant 5 minutes à 60°, diminue de 50 pour cent la radioactivité dans les différentes zones

de l'embryon; un traitement à la ribonucléase respecte 68 pour cent de l'activité initiale. Nous avons donc attribué 18 pour cent des traces à l'acide désoxyribonucléique et à une éventuelle fraction protéique labile; 32 pour cent de l'activité seraient donc imputables à l'acide ribonucléique.

En ce qui concerne l'incorporation de la glycine dans les acides nucléiques, nos résultats sont en bon accord avec les observations biochimiques de Smellie, MacIndoe, & Davidson (1953). Selon ces auteurs, qui ont travaillé sur des homogénats de foie, la glycine ^{15}N , tout comme le ^{32}P et le formiate ^{14}C d'ailleurs, s'incorpore beaucoup plus intensément dans l'acide ribonucléique que dans l'acide désoxyribonucléique.

Quant à l'incorporation de la glycine dans les protéines des embryons, elle représente 50 pour cent du phénomène total, si on fait abstraction des protéines labiles, dont l'importance demeure incertaine. Les traces, dans le cas des embryons, proviennent en majorité des noyaux: un dénombrement de ces traces donne un rapport de 5:2 en faveur de ces derniers. Le traitement à la ribonucléase semble respecter ce rapport, de même d'ailleurs que l'hydrolyse par HCl N: les protéines éliminées par cette hydrolyse, si elles existent, ne seraient donc pas particulièrement actives.

Daly et ses collaborateurs (1952) ont étudié l'incorporation de la glycine- ^{15}N dans les constituants chimiques des noyaux isolés: elle est faible dans l'acide désoxyribonucléique, plus marquée dans l'histone et beaucoup plus élevée dans les protéines résiduelles; dans ces dernières, elle devient comparable à celle du cytoplasme global. Ces auteurs font remarquer qu'à une intense activité cytoplasmique correspond toujours une très forte activité nucléaire. C'est à des résultats assez voisins qu'ont abouti aussi Smellie, MacIndoe, & Davidson (1953) qui ont utilisé également la glycine- ^{15}N .

Nos résultats ne peuvent donc être comparés directement avec ceux des biochimistes, qui ont utilisé un autre précurseur que nous; en outre il convient de faire remarquer qu'aucune expérience sur l'incorporation d'un acide aminé marqué n'a été effectuée sur des noyaux isolés en milieu non aqueux, selon la méthode de Behrens (1938); or le traitement par l'acide citrique, qui a toujours été employé jusqu'à présent dans les expériences sur l'incorporation d'isotopes, s'accompagne d'une perte importante des protéines (Allfrey *et al.*, 1952). Il n'est donc nullement impossible que l'acide citrique élimine des protéines particulièrement actives. Il serait particulièrement intéressant de traiter par de l'acide citrique dilué des coupes fixées au freezing-drying pour voir si on n'élimine pas ainsi des protéines nucléaires fortement radioactives.

RÉSUMÉ

L'analyse de l'induction neurale, au moyen d'organisateurs marqués à la glycine et à l'acide orotique a permis de mettre en évidence la migration des substances radioactives lors de la neuralisation.

L'incorporation des précurseurs est la plus considérable dans les régions en

SUMMARY

The analysis of neural induction by means of organizers tagged by glycine and orotic acid has demonstrated the migration of radioactive substances during neuralization.

The incorporation of these precursors, both as regards proteins and nucleic acids, is greatest in regions undergoing active morphogenesis. It seems to be particularly intense in the nuclei.

TRAVAUX CITÉS

- ALLFREY, V., STERN, H., MIRSKY, A. E., & SAETREN, H. (1952). The isolation of cell nuclei in non-aqueous media. *J. gen. Physiol.* **35**, 529-54.
- BEHRENS, B. (1938). Zell- und Gewebetrennung. *Handb. biolog. Arbeitsmeth.* Abt. V, T. **10**, 1363-92.
- BRACHET, J. (1941). La localisation des acides pentosenucléiques dans les tissus animaux et les œufs d'Amphibiens en voie de développement. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **53**, 207-57.
- (1945). *Embryologie chimique*. Liège: Dessoer.
- (1950). Quelques observations sur le mode d'action de l'organisateur chez les Amphibiens. *Experientia*, **6**, 56-57.
- & HUGON DE SCOEUX, F. (1949). Remarques sur le mode d'action de l'organisateur chez les Amphibiens. *Journées cyto-embryol. Belgo-néerl.*, Gand, **56**.
- & BRYGIER, J. (1953). Communication personnelle.
- DALY, M., ALLFREY, V. G., & MIRSKY, A. E. (1952). Uptake of glycine-N₁₅ by components of cell nuclei. *J. gen. Physiol.* **36**, 173-9.
- DE VINCENTIIS, M. (1952). Gli acidi nucleinici nell'organogenesi del cristallino. *Atti del Congr. della Soc. Oftal. Ital., Torino*, **13**.
- FICQ, A. (1954). Incorporation de la glycine-1-¹⁴C dans les oocytes d'Astéries. *Archives de Biologie, Liège et Paris* (sous presse).
- FRIEDBERG, F., & EAKIN, R. M. (1949). Studies in protein metabolism of the amphibian embryo. Uptake of radioactive glycine. *J. exp. Zool.* **110**, 33-46.
- GROBSTEIN, C. (1953). Morphogenetic interaction between embryonic mouse tissues separated by a membrane filter. *Nature, Lond.* **172**, 869-71.
- HOLTFRETER, J. (1948). Concepts on the mechanism of embryonic induction and its relation to parthenogenesis and malignancy. *Symp. Soc. exp. Biol.* **2**, 17-49.
- HURLBERT, R. B., & POTTER, V. R. (1952). A survey of the metabolism of orotic acid in the rat. *J. biol. Chem.* **195**, 257-70.
- KUNITZ, M. (1950). Crystalline desoxyribonuclease. Isolation and general properties. *J. gen. Physiol.* **33**, 349-62.
- MACDONALD, M. (1948). Proteolytic contaminants of crystalline ribonuclease. *J. gen. Physiol.* **32**, 33-37.
- MACKEEHAN, M. S. (1951). Cytological aspects of embryonic lens induction in the chick. *J. exp. Zool.* **117**, 31-64.
- NIU, M. C., & TWITTY, V. C. (1953). The differentiation of gastrula ectoderm in medium conditioned by axial mesoderm. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* **39**, 985-9.
- SMELLIE, R. M. S., MACINDOE, W. M., & DAVIDSON, J. N. (1953). The incorporation of ¹⁵N, ³⁵S, and ¹⁴C into nucleic acids and proteins in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 559-65.
- VENDRELY, R., & LIPARDY, J. (1946). Nucleic acids and bacterial nuclei. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **223**, 342-4.
- WADDINGTON, C. H. (1950). Passage of phosphorus-32 from dried yeast into amphibian gastrula ectoderm. *Nature, Lond.* **166**, 566-7.

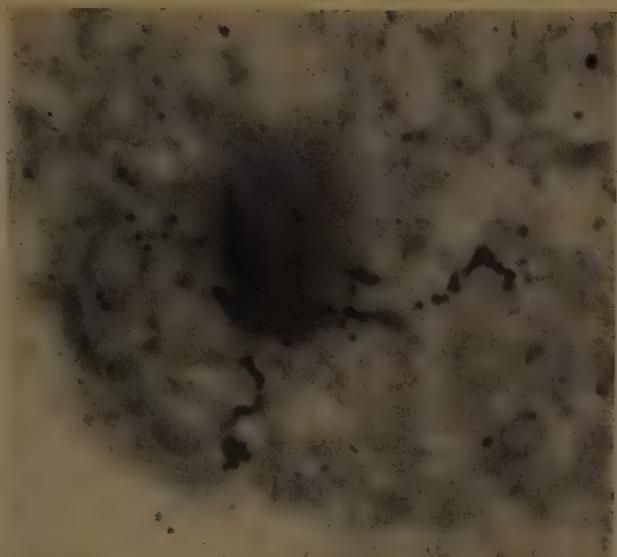


FIG. A

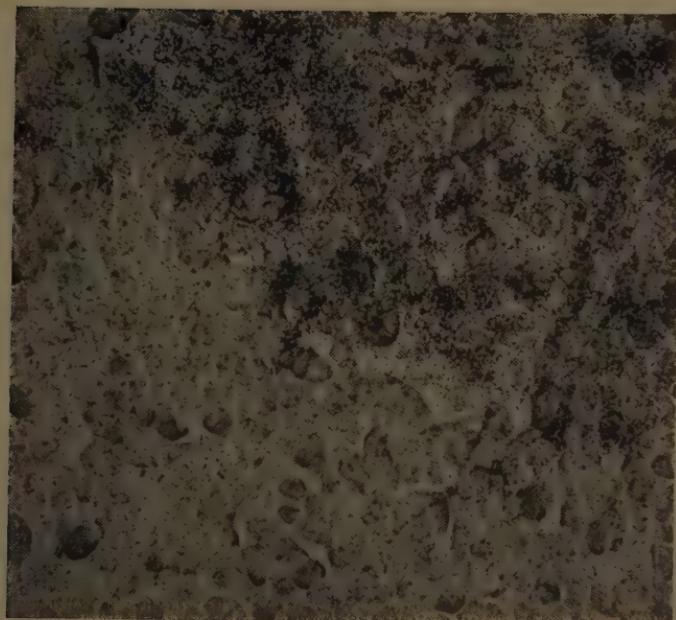


FIG. B

A. FICQ

Planche I



FIG. C

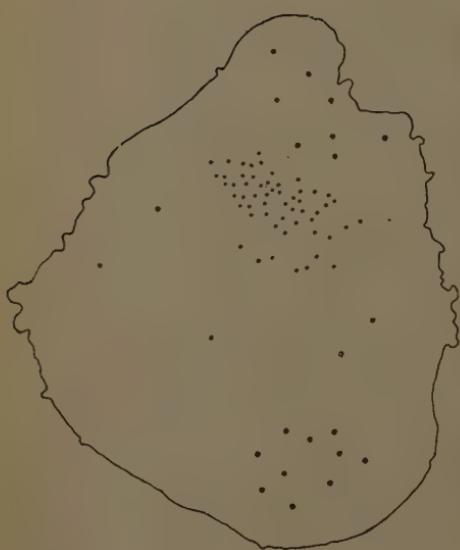


FIG. D

A. FICQ

Planche 2

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE 1

FIG. A. Deux électrons du ^{14}C émis par le noyau d'une cellule embryonnaire.
FIG. B. Coupe dans un explantat; le fragment fortement radioactif (organisateur d'Axolotl) est accolé à de l'ectoderme de *Rana temporaria*.

PLANCHE 2

FIG. C. Répartition de la radioactivité dans un embryon d'Axolotl présentant une induction. Le greffon (*Rana fusca*) fortement radioactif est marqué à la glycine- ^{14}C .
FIG. D. Répartition de la radioactivité dans un embryon d'Axolotl présentant une induction. Le greffon (*Rana fusca*) est marqué à l'acide orotique- ^{2-14}C .

(Manuscript received 23 : ii : 54)

Localisation et dosage du lithium dans les embryons d'Amphibiens

par ADRIENNE FICQ¹

Laboratoire de Morphologie animale, Université libre de Bruxelles

AVEC UNE PLANCHE

INTRODUCTION

IL Y A tout lieu d'espérer qu'une meilleure compréhension des curieux effets que le lithium exerce sur la morphogénèse rendrait de grands services pour l'étude de la détermination et de la différenciation embryonnaires.

Jusqu'à présent, cependant, le mode d'action de cet ion nous a échappé, en partie parce qu'il n'existe pas de méthode chimique assez sensible pour doser cet élément au point de permettre de déterminer sa localisation intracellulaire.

Il nous a semblé intéressant d'appliquer une nouvelle technique d'analyse autoradiographique du lithium par irradiation neutronique (Picciotto & Van Styvendael, 1951) et de l'adapter à cet important problème d'embryologie.

Nous avons donc tenté de suivre la distribution de l'élément toxique dans des coupes d'embryons lithinés de Batraciens à divers stades de leur développement.

La méthode autoradiographique nous ayant permis d'évaluer la concentration en lithium des embryons, nous avons cherché à contrôler ces données par des dosages de la teneur en lithium: la spectrographie d'émission nous a permis d'atteindre ce but, tant dans les embryons entiers que dans les fragments d'embryons et les fractions d'homogénats isolées par centrifugation différentielle.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

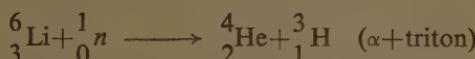
(a) Principe de la méthode

En soumettant à un flux de neutrons thermiques d'intensité convenable des coupes d'embryons lithinés, recouvertes d'émulsion photographique 'Pour recherches nucléaires', les atomes de lithium, en se désintégrant, émettent deux particules (α et triton) dont les trajectoires impressionnent l'émulsion sensible.

Le lithium comporte deux isotopes: ^6Li , 7·39 pour cent; et ^7Li , 92·61 pour cent.

¹ Author's address: Laboratoire de Morphologie animale, Université libre de Bruxelles, 1850 Chaussée de Wavre, Bruxelles, Belgium.

Le ^7Li n'ayant pas d'interaction avec les neutrons, le ^6Li est seul responsable de la réaction:



La section efficace de capture pour le mélange isotopique naturel du lithium est de 65 Barns. Les deux particules, α et triton, sont émises en sens opposé; la trajectoire totale offre donc un aspect rectiligne. Dans les émulsions Ilford utilisées, les longueurs des trajectoires sont respectivement:

Longueur totale	43.33 μ
Longueur de l' α	6.56 μ
Longueur du triton	36.77 μ

La pile atomique permet d'obtenir des flux de neutrons thermiques importants, ce qui est essentiel dans le cas de tels dosages, à l'exclusion des neutrons rapides qui donnent lieu à des protons de recul.

La technique photographique utilisée comme moyen de détection (Powell, Occhialini, Livesey, & Chilton, 1946) est basée sur l'observation des trajectoires individuelles et non sur celle du noircissement global, comme dans les méthodes autoradiographiques classiques. Le passage d'une particule ionisante à travers une émulsion sensible impressionne les grains d'halogénure d'argent traversés par la particule.

Les émulsions photographiques 'Pour recherches nucléaires' sont caractérisées par une concentration très élevée en AgBr et une dimension de grains de quelques dixièmes de microns. Il existe plusieurs types d'émulsion de sensibilités différentes. En développant l'image latente formée on peut révéler la trajectoire de la particule.

L'aspect d'une trajectoire est fonction de l'ionisation produite par la particule de son énergie et de la méthode de développement photographique utilisée.

Les conditions d'irradiation et de développement des émulsions nucléaires exposées à des flux intenses de neutrons ont été discutées par Faraggi, Bonnet, & Cohen (1952). La dose maxima de neutrons tolérable par la plaque est limitée par le noircissement dû aux rayons γ et β .

De plus, des trajectoires parasites sont dues à la présence d'éléments pouvant prêter à des confusions. La réaction (n, p) de l'azote donne lieu à des protons, dont la trajectoire a une longueur de 6μ . Le choc des neutrons rapides sur l'hydrogène de la préparation et de la gélatine produit des protons de recul qui ne sont discernables des tritons du Li^+ que si leur trajectoire excède 36μ .

Les traces des protons de recul inférieures à 36μ , et celles qui sont dues à la contamination de la préparation en lithium constituent le back-ground qu'il faut évidemment soustraire du nombre total de traces observées.

(b) Application de la méthode aux œufs d'Amphibiens

Des œufs indivis et des blastulas, préalablement dégangués, ont séjourné

pendant 3 heures dans une solution de LiCl, à la concentration de 1 pour cent, dans le cas des Axolotls, de 0·66 pour cent dans celui des Pleurodèles. Après lavage à l'eau courante, les embryons ont été fixés par congélation sous vide (freeze-drying), selon Gersh (1938). L'emploi d'un fixateur chimique qui eût, presqu'à coup sûr, déplacé l'ion Li^+ , très mobile, a été ainsi évité.

Les embryons, après la fixation par congélation brusque dans de l'isopentane à la température de l'air liquide, ont été déshydratés pendant 48 heures à -40°C ., sous un vide poussé.

L'inclusion à la paraffine a été également effectuée sous vide.

Des coupes de 10μ ont été déposées sur une lame porte-objet traitée au préalable par une solution de gélatine à l'alun, afin d'améliorer l'adhérence de l'émulsion photographique; l'albumine, dans ce cas, n'est pas nécessaire. Les coupes ont ensuite été étalées dans une goutte d'alcool pour éviter l'éventuelle diffusion du Li^+ dans l'eau.

Les lames ont été alors séchées à la température ordinaire; les coupes déparaffinées dans le xylol (déshydraté par CaCl_2) ont été ensuite recouvertes de l'émulsion sensible (G, Ilford).

Cette émulsion a été fondue au bain-marie à la température de 48° et une goutte d'environ 0·1 c.c. a été déposée à l'endroit de la préparation, de manière à obtenir une épaisseur de 50 à 100μ d'émulsion sèche.

Les lames ont alors été séchées à nouveau pendant 24 heures dans un courant d'air tiède; toutes ces manipulations s'effectuaient, bien entendu, en chambre noire, à la lumière rouge.

Les préparations pouvaient, dès lors, être exposées au flux de neutrons. Diverses séries de coupes ont été soumises à un bombardement de 10^9 , 10^{10} , et 10^{11} neutrons/cm.², à la pile de Châtillon. Le flux limite, pour ces émulsions, semble être de $10^{10}/\text{cm.}^2$. L'usage des émulsions du type Ilford E 1 que nous ne possédions pas à ce moment aurait permis un flux de 10^{11} neutrons/cm.² (Faraggi *et al.*, 1952).

Une seconde méthode a consisté à appliquer, contre la préparation biologique, une plaque sensible (Emulsion C 2) et à exposer le tout aux neutrons. Cette technique implique toutefois un repérage qui peut introduire certaines causes d'erreurs.

L'observation simultanée de la préparation et de l'émulsion, qui est rendue possible par la méthode de l'émulsion coulée, s'est montrée à la fois moins fastidieuse et plus précise. Elle offre, également, l'avantage de permettre une localisation immédiate.

Les plaques photographiques et les émulsions coulées ont ensuite été développées par la méthode d'Occhialini-Dilworth (Dilworth *et al.*, 1950) où l'imprégnation de l'émulsion par le révélateur se fait à 4° pendant 45 minutes. L'action révélatrice étant inhibée à cette température, la révélation sera homogène quand le développement aura lieu, hors du bain, à 22° pendant 45 minutes.

Le développement photographique a tout avantage à être effectué le plus vite

possible après l'exposition à la pile, certains éléments activés émettant des traces parasites qui peuvent brouiller l'observation.

Le révélateur utilisé fut le suivant:

Amidol (diamidophénol)	1·125 gr.
KBr, solution 10%	2 c.c.
Sulfite de Na anhydre	4·5 gr.
Eau distillée	250 c.c.

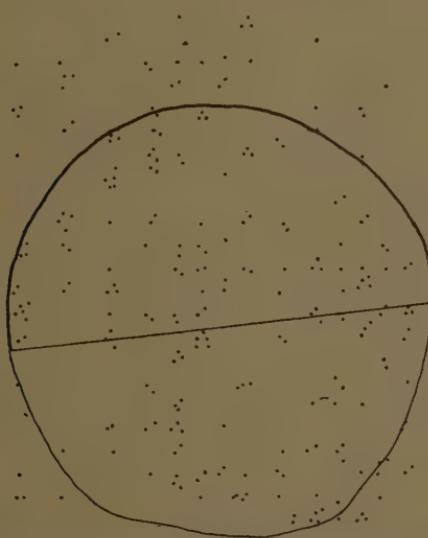
Après un bain d'arrêt, les préparations sont fixées dans une solution concentrée d'hyposulfite.

La fixation est terminée après 5 heures environ et les plaques sont alors lavées par élimination progressive du fixateur à l'eau courante.

Ce séchage final doit être lent, pour éviter les déformations de la gélatine (Planche, fig. A et B).

(c) Résultats des expériences

Cinq séries d'expériences ont porté sur des œufs non segmentés et des blastulas de Pleurodèles et d'Axolotl, ainsi que sur des œufs indivis de Pleurodèles qui avaient été centrifugés dans une solution isotonique de saccharose.



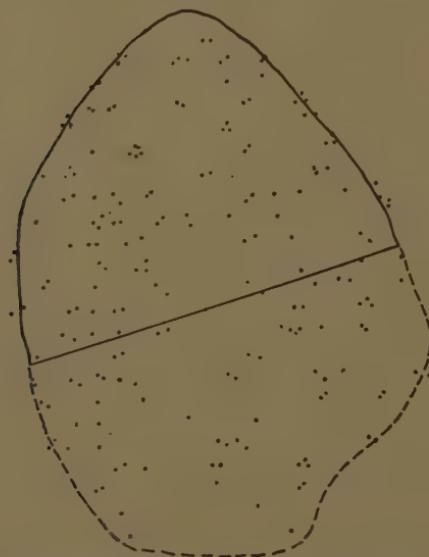
TEXT-FIG. 1. Répartition du lithium dans une coupe de Pleurodèle. $2 \cdot 10^{10}$ neutrons/cm.² L'embryon est divisé en deux parties égales, la moitié dorsale étant limitée par un trait gras.

Chaque expérience comportait des lots d'embryons lithinés et d'embryons témoins: ces derniers, à part le traitement au lithium, étaient soumis à toutes les manipulations qui viennent d'être décrites.

L'observation microscopique des coupes a permis de représenter l'origine des traces sur un graphique, selon les coordonnées du chariot de la platine microscopique (figs. 1, 2, et 3, dans le texte).



TEXT-FIG. 2. Répartition du lithium dans une coupe d'œuf indivis de Pleurodèle, centrifugé. 10^{10} neutrons/cm.² Deux traits limitent la région correspondante aux mitochondries et aux grains de pigment où la concentration en lithium est plus élevée.



TEXT-FIG. 3. Répartition du lithium dans une coupe de blastula avancée d'Axolotl. $2 \cdot 10^{10}$ neutrons/cm.² L'embryon est divisé en deux parties égales, la moitié dorsale étant limitée par un trait gras.

Il ressort des observations autoradiographiques que, dans l'œuf indivis, tant chez le Pleurodèle que chez l'Axolotl la distribution du Li⁺ dans les embryons traités est homogène.

Dans les coupes-témoins, la concentration en Li^+ est sensiblement du même ordre de grandeur que celle du back-ground, qui était d'ailleurs relativement élevé: le verre et la gélatine sont toujours légèrement contaminés par du lithium, comme l'a d'ailleurs confirmé l'analyse spectrographique de leurs cendres.

Dans les blastulas des deux espèces un rapport de 1·9 a été observé entre les moitiés dorsales et ventrales. Sur les 1,500 traces dénombrées dans les 10 coupes observées, 940 sont attribuables à l'ensemble des moitiés dorsales, 540 à l'ensemble des moitiés ventrales de l'embryon. Ces valeurs, et les erreurs probables sont consignées dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Répartition de lithium dans les coupes de blastulas d'Amphibiens lithinés

	<i>10 coupes de blastulas</i>	<i>moitiés dorsales</i>	<i>moitiés ventrales</i>	<i>rapport D/V</i>
Nombre total de traces	$1,500 \pm 23$	940 ± 18	560 ± 14	—
Background . . .	300 ± 11	150 ± 7	150 ± 7	—
Nombre de traces dues au Li^+ . . .	$1,200 \pm 34$	790 ± 25	410 ± 21	1.95 ± 0.08

Les différences accusées par ces valeurs sont nettement supérieures aux fluctuations statistiques: il y a donc une accumulation du lithium dans la région dorsale à la fin de la segmentation.

Dans les coupes d'œufs centrifugés, une concentration accrue du lithium se manifeste, dans 75 pour cent des cas étudiés, au niveau de la zone correspondant aux grains de pigment et aux mitochondries.

Enfin, nous avons tenté d'estimer la concentration en Li^+ dans les embryons lithinés. Pour donner à cette mesure une valeur absolue il faudrait connaître avec exactitude le nombre de neutrons et le parcours du lithium dans l'échantillon.

En première approximation, et en supposant négligeable l'absorption de la coupe, nous avons appliqué la relation:

$$N = n \cdot \sigma \cdot Li$$

où: N = le nombre de désintégrations/ cm^2 , n = le nombre de neutrons/ cm^2 , Li = le nombre d'atomes de Li présents par cm^2 dans la coupe, σ = la section efficace.

Nous avons trouvé, dans les embryons intoxiqués, une concentration de $6 \cdot 10^{-4}$ gr. de Li/gr. de poids sec, soit 0·06 pour cent.

(d) Dosage du lithium par spectrographie d'émission

Afin de vérifier ces résultats, nous avons effectué un contrôle par la spectrographie d'émission, méthode d'analyse également très sensible.

L'analyse a été effectuée avec des microélectrodes de graphite, forées d'un trou pour y déposer l'échantillon. Chaque échantillon déposé a été pesé à la microbalance afin d'obtenir des résultats quantitatifs.

La ligne 6707 Å a été utilisée pour les mesures quantitatives. La fente était de 35μ , le courant de 6 ampères et le temps de 30 secondes. Les plaques Gevaert, G Scientia 58 A 64, micrograin panchro ont été développées pendant 5 minutes dans du révélateur DK 50, puis fixées au fixateur F 54 a.

Nous avons procédé à deux types d'expériences: tout d'abord des dosages du Li ont été effectués dans des embryons entiers et dans des moitiés dorsales et ventrales d'embryons lithinés ou non; ensuite, nous avons suivi la teneur en lithium des diverses fractions d'homogénats d'embryons, isolées par centrifugation différentielle.

TABLEAU 2

*Concentration du lithium déterminée par spectrographie d'émission
dans des embryons d'Amphibiens lithinés*

	Teneur en lithium, γ			Teneur en lithium, γ
	Témoins	Lithinés		
<i>Rana fusca</i>				
5 oocytes	0	0·2	1 œuf injecté de 0·05 γ de Holtfreter	0
10 oocytes	0	0·5	3 œufs injectés de 0·05 γ de Holtfreter	0
<i>Pleurodèles</i>				
1 œuf indivis	0	0·05	1 œuf injecté de 0·05 γ de Li	0·05
3 œufs indivis	0·05	0·2	3 œufs injectés de 0·05 de Li chacun	0·15
1 blastula	0	0·1	<i>Solution I</i> (25 mm. ³) Holtfreter	0·01
3 blastulas	0·02	0·4	<i>Solution II</i> (25 mm. ³) LiCl 0·66% dans eau de ville	20

	Teneur en lithium, γ			
	Moitiés dorsales		Moitiés ventrales	
	Témoins	Lithinés	Témoins	Lithinés
<i>Pleurodèles</i>				
5 œufs indivis .	0	0·1	0	0·1
6 morulas .	0	0·05	0	0·01
8 blastulas .	0	1	0	0·5
10 blastulas .	0	1	0	0·5
15 blastulas .	0	1	0	0·4
25 blastulas .	0	5	0	1
<i>Rana fusca</i>				
20 blastulas .	0	5	0	2

Lors des premières expériences, nous avons déposé chaque embryon sur un verre de montre en pyrex, absorbé l'excès de milieu au papier filtre, séché rapidement à la flamme et coupé l'embryon en deux, sous la loupe, au moyen d'une anse en platine.

Le tableau 2 donne les valeurs absolues en γ de lithium correspondant aux différents échantillons.

Des mesures de la teneur en lithium des solutions utilisées pour la culture (Holtfreter) et pour le traitement des embryons (LiCl 0·66 pour cent dans l'eau

de ville) ont été faites, en outre, sur des gouttes de 25 mm^3 , prélevées à la micropipette.

Les mesures spectrographiques ont été effectuées par le Docteur D. Shugar, à qui va notre gratitude.

Enfin, dans un but d'étalonnage, nous avons injecté dans des œufs témoins, une quantité connue de lithium (0.05γ). Ces injections ont été effectuées au moyen du micromanipulateur de Fonbrune, par Melle S. Gothié, que nous remercions vivement. Le tableau 2 donne les résultats de ces essais.

Alors que les observations faites par l'autoradiographie avaient fourni des valeurs qui étaient dans le rapport de 1.9 pour les moitiés dorsales et ventrales de la blastula, les mesures spectrographiques, on le voit, ont montré des différences plus accusées encore (rapport de 2.5 entre les deux types de fragments). Cette divergence apparente peut tenir à la densité élevée du vitellus; nous avons en effet tenu compte, non des volumes, mais des poids secs des moitiés d'embryons, lors des mesures spectrographiques.

Lors de la deuxième série d'expériences, nous avons utilisé la technique de fractionnement décrite par Recknagel (1950), où l'homogénéisation des embryons de Batraciens s'effectue dans un tampon au phosphate 0.05 M à pH 7.4.

Pour éviter les échanges possibles entre le Li^+ et le K^+ de la solution tampon, nous avons remplacé, par la suite, le milieu au phosphate par une solution de saccharose isotonique (0.25 M) dans de l'eau bidistillée. Une solution hyper-tonique (0.88 M), qui avait été utilisée lors d'un premier essai, ne s'élimine pas complètement lors de la dessiccation des culots de centrifugation et ne convient donc pas.

Ces expériences ont porté sur des lots comportant un nombre égal d'œufs lithinés et d'œufs témoins (Pleurodèles 90, 125, 150, 150).

Les constituants suivants ont été isolés:

- (1) le vitellus, qui se sédimente à 50 g., après 15 minutes;
- (2) les granules de pigment mélânique sédimentés à 2,000 g. après 10 minutes;
- (3) les mitochondries qui se déposent à 2,000 g. après 40 minutes.

Nous avons tenté ensuite d'isoler la fraction des microsomes en centrifugeant le surnageant, pendant 35 minutes, à 33,500 t/minutes à l'ultracentrifugeuse Spinco: mais le culot ainsi obtenu a été tellement minime qu'il n'a pas été possible de l'analyser.

- (4) le surnageant de l'ultracentrifugation, qui comprend un peu de lipides, a été évaporé.

On trouvera, dans le tableau 3, les résultats de ces dosages.

En analysant ces résultats, on observe que les concentrations les plus élevées en Li^+ correspondent au surnageant et à la fraction granulaire pigmentée.

Il paraît évident que le Li^+ , labile, risque de diffuser dans le milieu d'homogénéisation: sa présence dans le surnageant n'est donc nullement surprenante.

La teneur élevée du vitellus en lithium dans les expériences II et III peut s'expliquer par la difficulté d'obtenir une sédimentation très nette lorsque la

centrifugation se fait dans le saccharose: cette fraction vitelline risque donc d'être contaminée par une petite proportion de granules pigmentaires qui se déposent déjà à faible vitesse.

La concentration élevée du lithium dans les granules de pigment, que montrent ces expériences, concorde bien avec les observations faites plus haut par autoradiographie: on a vu que le lithium s'accumule dans l'anneau pigmentaire des œufs entiers centrifugés.

TABLEAU 3

Concentration du lithium des fractions d'homogénats d'embryons lithinés et non, isolées par centrifugation différentielle. T = Témoins; Li = Lithinés

	Exp. I		Exp. II		Exp. III		Exp. IV	
	125 œufs témoins	125 œufs Li	150 œufs témoins	150 œufs Li	90 œufs témoins	90 œufs Li	150 œufs témoins	150 œufs Li
Pleurodèles	Quantités absolues							
	Li en γ	% Li						
Vitellos T	0.01	0.3	0	0	0.05	0.15	0	0
Vitellos Li	0.1	4	0.3	6	0.2	5	0.2	8
Pigment T	0	0	0	0	0	0	0	0
Pigment Li	0.15	11.5	0.1	6	0.2	9	0.15	7
Mitochondries T	0	0	0	0	0	0	0	0
Mitochondries Li	0	0	0.1	4	0	0	0	0
Surnageant T	0.05	2.5	0	0	0	0	0	0
Surnageant Li	0.8	80	0.15	11.5	0.2	60	0.2	20

(e) Distribution du lithium pendant l'oogénèse

Enfin, nous avons tenté une expérience 'in vivo' sur une grenouille en période d'oogénèse active: une injection de 2 c.c. de Ringer pour Batraciens, contenant 30 γ de Li, a été faite à 3 reprises, à 24 heures d'intervalle, dans la cavité péritonéale d'une *Rana fusca* femelle.

Les fragments de l'ovaire de l'animal lithiné et d'une grenouille témoin ont été fixés par Freezing-Drying; ils ont ensuite été traités comme dans les expériences précédentes d'autoradiographie.

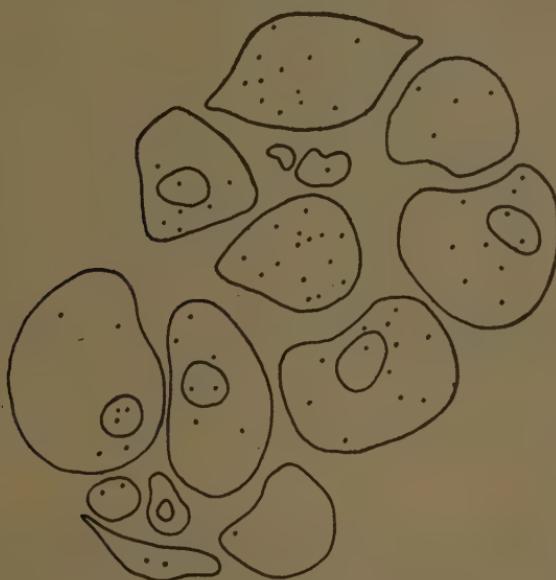
Dans 28 coupes d'ooctyes observées, on a obtenu une moyenne de 10 traces par oocyte, réparties également dans la vésicule germinative et dans le cytoplasme (fig. 4 dans le texte).

La concentration, calculée par la formule de la section efficace, est de $5 \cdot 10^{-4}$ gr./gramme de poids sec.

Dans ce cas, encore, le contrôle spectrographique s'est montré pleinement satisfaisant; il a indiqué une teneur en Li⁺ du même ordre de grandeur que celle que l'on trouve dans les œufs en voie de développement.

Les oocytes-témoins ne contiennent, par contre, qu'une quantité négligeable de l'élément.

Il semble donc qu'à ce stade la perméabilité de la membrane oocytaire soit telle que le Li⁺ puisse pénétrer et, éventuellement, se concentrer dans l'ovaire.



TEXT-FIG. 4. Répartition du lithium dans une coupe d'ovaire de *Rana fusca* injectée de Li⁺, 10^{10} neutrons/cm.²

DISCUSSION

De nombreuses hypothèses ont été émises en ce qui concerne le lieu et le mode-d'action du lithium, tant chez les Échinodermes que chez les Batraciens; on a supposé, notamment, qu'il pourrait s'agir d'une rupture de l'équilibre entre les diverses fractions de particules (Gustafson, 1952), d'une atteinte du métabolisme glucidique et phosphoré (Lindahl & Kiessling, 1951), d'une action sur l'état physique de certaines protéines ovulaires (Ranzi, 1951), ou d'une lésion du noyau cellulaire: en ce qui concerne cette dernière hypothèse, on ne peut oublier que le noyau intervient indirectement dans le développement des particules cytoplasmiques (Brachet, 1952). Nous savons aussi, par les travaux de Raven et de son école (1952), que les noyaux des œufs de limnée traités par le lithium présentent des anomalies cytologiques.

Dans ces conditions, il n'est pas étonnant que nous ayons observé une accumulation du lithium dans la région de l'embryon où, simultanément, les populations de granules cytoplasmiques sont les plus denses, les noyaux les plus nombreux, le métabolisme le plus actif et la morphogénèse la plus intense. Dans le cas des

Batraciens, c'est la région dorsale de l'embryon qui est, en outre, la plus pigmentée. Hall (1942) avait remarqué déjà, en opérant sur des explantats, que l'ectoderme lithiné peut dans certains cas se développer de façon normale, alors que l'organisateur lithiné ne le fait jamais. Hall en a conclu que le Li⁺ agirait surtout sur l'organisateur.

Pour en revenir à nos propres observations, nous n'avons malheureusement pas pu préciser si l'accumulation du lithium se produit dans les noyaux ou si elle est strictement cytoplasmique. Dans le cytoplasme, en tous cas, les dosages ont démontré une localisation préférentielle dans les granules mélaniques.

Le rôle physiologique des granules de pigment n'est pas encore suffisamment connu pour qu'on puisse déterminer la nature du système enzymatique qui serait inhibé par le lithium à leur niveau. La seule tentative qui ait été faite dans ce sens a été celle de Recknagel (1950): il a observé que les grains de pigment contiennent une certaine proportion, d'ailleurs inférieure à celle qu'on trouve dans les mitochondries, de cytochrome-oxydase; mais on sait que cet enzyme n'est précisément pas touché par le lithium (Lallier, 1953). On ne peut donc encore émettre aucune hypothèse valable sur la signification que pourrait avoir l'accumulation du lithium dans les grains de pigment, tant en ce qui concerne la morphogénèse que la biochimie du développement.

RÉSUMÉ

Un essai de dosage et de localisation du lithium dans les embryons de Batraciens lithinés a été entrepris au moyen de l'autoradiographie par irradiation neutronique.

Une accumulation de lithium dans la partie dorsale de l'embryon et une concentration de ce toxique au niveau des granules de pigment ont été observées.

SUMMARY

An estimate of content and localization of lithium within lithium-treated amphibian embryos has been made by means of autoradiography after neutron irradiation.

An accumulation of lithium in the dorsal part of the embryo and a concentration associated with the pigment granules was observed.

Nous tenons à remercier le Centre de Physique nucléaire de Bruxelles et en particulier M. le Dr Picciotto pour l'aide et les conseils qu'il nous a prodigués à l'occasion de ce travail. Notre gratitude va également au Service de la Pile de Châtillon et à Mme H. Faraggi grâce à qui les irradiations ont pu être effectuées.

TRAVAUX CITÉS

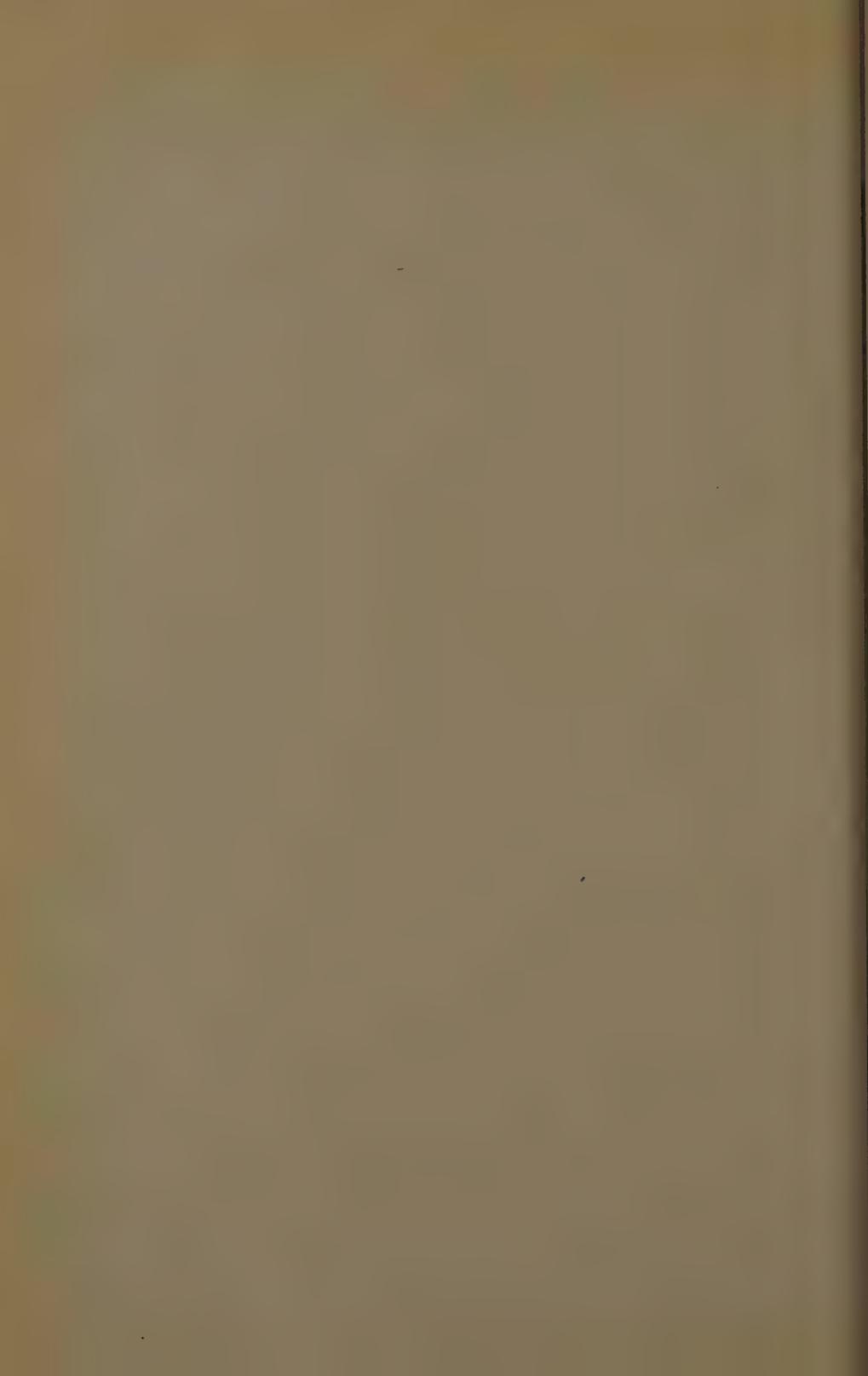
- BRACHET, J. (1952). *Le Rôle des acides nucléiques dans la vie de la cellule et de l'embryon*. Liège: Desoer.
- DILWORTH, C., OCCHIALINI, G. P. S., & VERMAESEN, L. (1950). On processing nuclear emulsions concerning temperature development. *Bull. Centre Phys. nucl. Bruxelles*, **13A**.



FIG. A



FIG. B
A. FICQ



- FARAGGI, H., BONNET, A., & COHEN, M. J. (1952). Irradiation et développement des émulsions nucléaires exposées à des flux intenses de neutrons thermiques accompagnés de rayons γ . *J. Phys. Radium*, suppl. au no. 7, **13**, 105A–111A.
- GERSH, I. (1938). Improved histochemical methods for chloride phosphate, carbonate and potassium applied to skeletal muscle. *Anat. Rec.* **70**, 311–29.
- GUSTAFSON, T. (1952). *Nitrogen Metabolism, Enzymic Activity and Mitochondrial Distribution in relation to Differentiation in the Sea-urchin Egg*. Uppsala.
- HALL, T. S. (1942). The mode of action of lithium salts in Amphibian development. *J. exp. Zool.* **89**, 1–98.
- LALLIER, R. (1953). *Thèse de Doctorat*. Paris.
- LINDAHL, P. E., & KISSLING, K. H. (1951). On accumulation of inorganic pyrophosphate in the cleaving sea urchin egg caused by lithium ions. *Ark. Kemi*, **3**, 97–102.
- PICCIOTTO, E. E., & VAN STYVENDAEL, M. Dosage et localisation du lithium par réaction nucléaire dans les minéraux. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **232**, 855–7.
- POWELL, C. F., OCCHIALINI, G. P. S., LIVESLEY, D. L. & CHILTON, L. V. (1946). A new photographic emulsion for the detection of fast charged particles. *J. Sci. Instrum.* **23**, 5, 102.
- RANZI, S. (1951). The proteins in the cell and in embryonic development. *Experientia*, **7**, 169–74.
- RAVEN, CHR. P. (1952). Morphogenesis in *Limnea stagnalis* and its disturbance by lithium. *J. exp. Zool.* **121**, 1–78.
- RECKNAGEL, R. O. (1950). Localization of cytochrome oxidase on the mitochondria of the frog egg. *J. cell. comp. Physiol.* **35**, 111–29.

EXPLICATION DE LA PLANCHE

FIG. A. Traces d' α et de tritons issues d'une coupe de blastula d'Axolotl lithinée.

FIG. B. Trajectoire d' α et de triton (36μ) dans l'émulsion photographique.

(Manuscript received 23:ii:54)

The Effect of Three Antimetabolites on Sea-Urchin Development

by SVEN HÖRSTADIUS and TRYGGVE GUSTAFSON¹

From the Zoological Institute, Uppsala, and Wenner-Gren's Institute for Experimental Biology, Stockholm

THE metabolic background for morphogenesis has been the object of intense investigations during the past decades. As an approach to this problem the metabolic effects of the vegetalizing lithium ion and the animalizing thiocyanate ion have been investigated (cf. Lindahl, 1936, and Gustafson, 1952). The studies of antimetabolites (growth-factor analogues) during the last decade have opened pathways for interfering with the embryonic metabolism in a predictable way. Using the antimetabolites it is now possible to get a deeper insight into the relation between metabolic processes and different developmental trends.

The effect of some antimetabolites on the early development of the eggs of *Psammechinus miliaris* were studied during the summer of 1953 at Kristinebergs Zoologiska Station, Sweden. The results obtained with 8-chloroxanthine, β -phenyllactic acid, and 3-acetylpyridine will be reported here. The substances were obtained from the Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio. The statements regarding the antimetabolic character of the substances are taken from the catalogue of that firm.

8-CHLOROXANTHINE

8-chloroxanthine is an antimetabolite to purines and nucleic acid. A stock solution of 0·2 per cent. in sea-water was made and the pH adjusted to 8·2. Cleavage was brought to a standstill in a solution of this concentration, but proceeded in 0·02 per cent. without any sign of damage to the cells. In all the series described a concentration below 0·02 per cent. was used, and the eggs were placed in the solution immediately after fertilization except as otherwise stated.

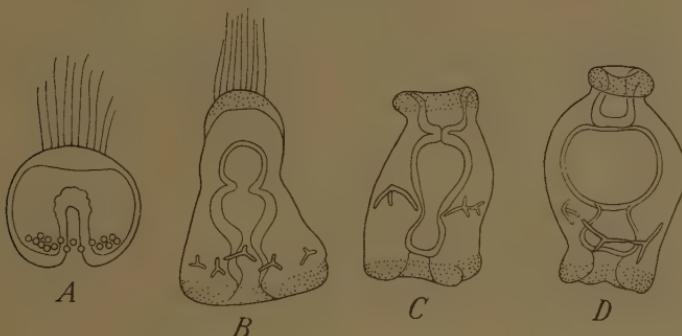
In some series it was noted that the apical tuft of the gastrula was somewhat enlarged (Text-fig. 1 A, B), a sign of a slight animalization, but on the other hand an unusually large archenteron was found in another series.

The tendency to differentiate into radially symmetrical larvae in 8-chloroxanthine is spectacular. In many series 100 per cent. of the larvae showed a perfect

¹ Authors' addresses: Zoologiska Institutionen, Uppsala, Sweden; Wenner-Grens Institut, Norrtullsgatan 16, Stockholm Va, Sweden.

radial symmetry at an advanced stage. Text-fig. 1B represents an early stage before the break-through of the stomodaeum. The archenteron is straight, its tip directed towards the somewhat enlarged apical plate. Small triradiate spicules form a ring around the base of the archenteron. Text-fig. 1 C and D illustrate two fully differentiated larvae, with apical mouth surrounded by a ciliated band.

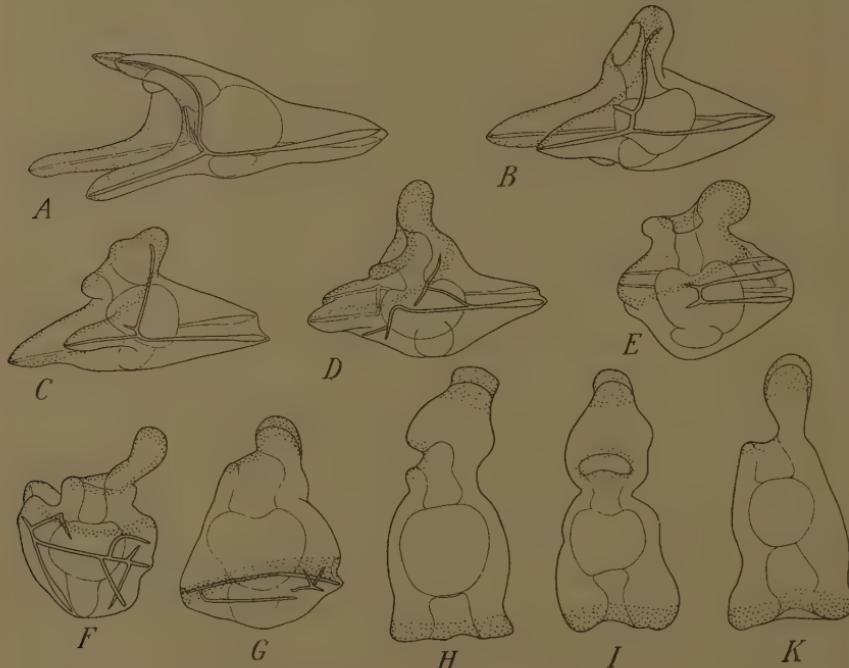
In some series we find all kinds of intermediate forms between plutei and the radial types shown in Text-fig. 1 C and D. A study of these intermediate forms shows the progressive change from the normal bilateral symmetry of the pluteus



TEXT-FIG. 1. Larvae treated with 8-chloroxanthine. A: Gastrula with enlarged apical tuft. B: Radial larva before the formation of mouth. C, D: Fully differentiated radial larvae.

(Text-fig. 2A) to a perfect radial symmetry. The drawings in Text-fig. 2 do not of course illustrate the transformation of single larvae from a bilateral to a radial stage, but reproduce larvae in which the factor interfering with the development of bilateral symmetry has been more or less effective. In a larva only slightly affected by the agent the oral lobe is not bent in the ventral direction (Text-fig. 2 B-D) as in the normal pluteus (A) and no oral arms grow out. The most animal part of the larva, i.e. the apical plate of the gastrula, which normally forms the edge of the oral lobe between the oral arms, instead points slightly 'backwards'. The normal ventral bend of the oesophagus fails to appear, the digestive tract tending to retain the straight form it has in the gastrula. The anal arms and the skeleton may still be fairly normal, although of course the oral rods follow the shift of the oral lobe. In larvae which have been more influenced by the agent the skeleton becomes more irregular. Neither anal rods nor body rods are developed in a typical way, and supernumerary rods appear in radial arrangement. As a consequence the shape of the body becomes more rounded (Text-fig. 2 E-G). In these intermediate types we also find transition forms (D-E) between larvae with one continuous ciliated band, as in the pluteus, and more radial larvae with two bands (F, G). The more pronounced the radial symmetry is, the more vegetal becomes the position of the lower band (F-K). In the larvae of this type the

animal ciliated band shows sign of degeneration in the region of the mouth. The upper ciliated band in the larvae (Text-fig. 1 c, d) seems to be derived from the ciliated part of the stomodaeum. The remaining part of the ciliated band, corresponding to the greater part of the apical plate, forms a ciliated plate at the tip of the oral lobe (Text-fig. 2 h-i). In larvae like Text-fig. 2k this lobe drops off after some days. These larvae thereby attain the shape of perfectly radial larvae like those drawn in Text-fig. 1 c, d.

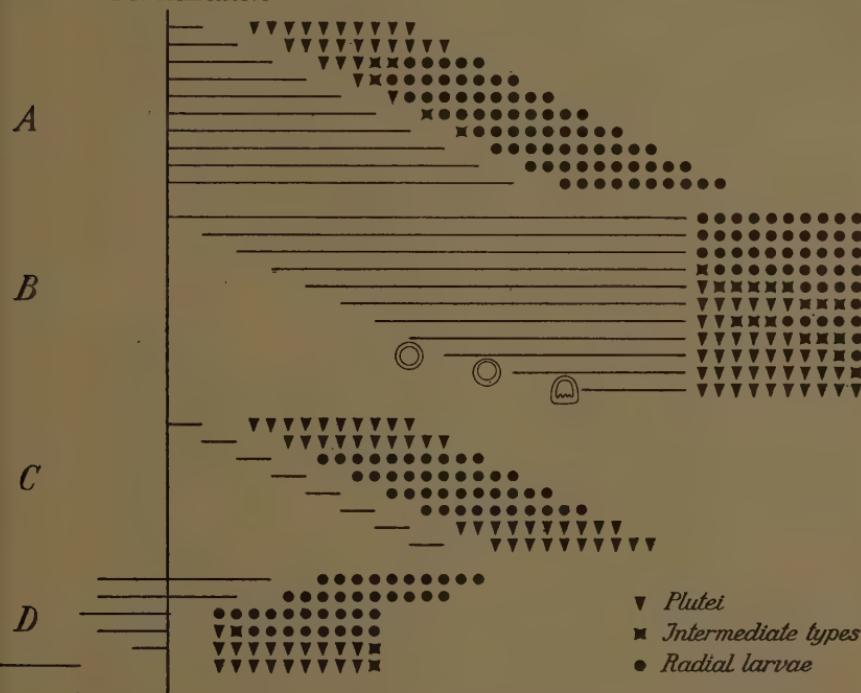


TEXT-FIG. 2. A: Normal pluteus. B-K: Larvae treated with 8-chloroxanthine showing different degrees of change from bilateral to radial symmetry. Explanation in text.

This picture of a gradual change from bilateral to radial symmetry has been obtained by comparing already differentiated larvae. Because of lack of time we did not have the opportunity to follow the development of single larvae. We therefore have to leave open the question of whether these particular radial larvae (Text-fig. 1 c, d) developed in a direct way, that is to say, whether a mouth actually did break through the apical plate (cf. Text-fig. 1b). One of us has observed the mouth to break through the apical plate in connexion with the study of another series of radial larvae obtained after treatment with detergents (Gustafson & Sävhagen, 1949).

We also determined the period of early development during which the sea-urchin egg is most sensitive to 8-chloroxanthine. Some of these experiments are recorded in Text-fig. 3. In one series eggs from the same culture were transferred from 8-chloroxanthine to normal sea-water 1–10 hours after fertilization (Text-fig. 3A). Treatment with 8-chloroxanthine during the first 2 hours had no effect.

Fertilization

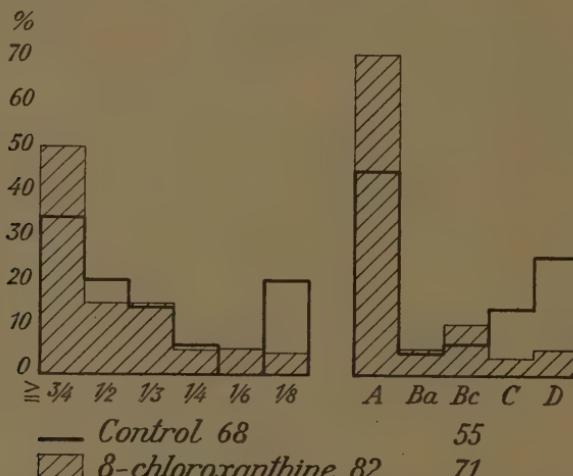


TEXT-FIG. 3. Periods of sensitivity to 8-chloroxanthine. The horizontal lines represent the length of treatment after or before fertilization (vertical line). The shortest horizontal lines correspond to 1 hour. Triangles, squares, and circles indicate the percentage of plutei, intermediate forms, and radial larvae.

After 3 hours in 8-chloroxanthine only 30 per cent. of the embryos developed into plutei, 20 per cent. showed intermediate forms, and 50 per cent. differentiated as radial larvae. With longer treatment the very great majority of larvae were of radial type. In another series (Text-fig. 3B) the eggs were placed in 8-chloroxanthine at the time of fertilization and 1–12 hours after fertilization and left there until 24 hours after fertilization. This material gave 100 per cent. of radial larvae in the populations transferred to 8-chloroxanthine 0–2 hours after fertilization. The first signs of bilateral symmetry appeared in the lot transferred to 8-chloroxanthine 3 hours after fertilization. Those placed in

8-chloroxanthine 7 hours or longer after fertilization showed only little disturbance of the bilateral symmetry.

In a third series (Text-fig. 3c) the treatment was restricted to 1 hour, i.e. 0–1, 1–2 hours, &c., after fertilization. As shown in the figure, the treatment during the first 2 hours had no effect. Beginning with treatment during the third hour there is a sudden change to 100 per cent. radial larvae, prevailing through the sixth hour. The change back to normal plutei is equally sudden and begins when the embryos are treated during the seventh hour.



TEXT-FIG. 4. Animalizing effect of 8-chloroxanthine on animal halves. The columns indicate the percentage of different types. Columns with thick lines: control halves. Hatched columns: treated halves. Left row: frequency of the types $\frac{1}{4}$ to $\frac{1}{8}$ on the first day after operation ($\frac{1}{4}$ is the most animal type, covered nearly all over with stiff cilia; $\frac{1}{8}$ has a typical apical tuft). Right row: the frequency of the types A to D the following day (A is the most animal type, a uniformly ciliated blastula; D the most vegetal type with ciliated band and stomodaeum).

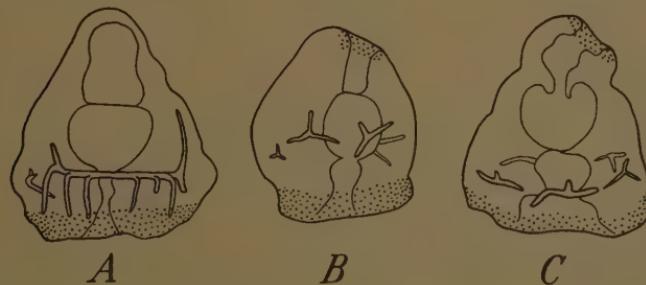
The three series reproduced (Text-fig. 3 a–c) were not the only experiments made. Several other series gave similar although not quite identical results. Different batches of eggs show differences in sensitivity. Thus, for example, egg material in experiment c (Text-fig. 3) is evidently more uniform than that of experiment b. From the results presented here it might seem that the period of sensitivity is confined to about 3 to 6 hours after fertilization. However, this does not appear to be the case as shown by the following experiment (expt. d, Text-fig. 3). It is not surprising that a treatment for 2 hours before and 3 hours after fertilization results in radial larvae in view of the above results. But eggs subjected to 8-chloroxanthine for 2 hours before and 2 hours after fertilization also gave 100 per cent. radial larvae. We saw in series c that a treatment for 1 hour

was enough to abolish the bilateral symmetry 3 to 5 hours after fertilization, but was ineffective during the first 2 hours. It is now evident that an earlier treatment will also have this effect provided the treatment lasts long enough. The entire treatment can even take place before fertilization ($2\frac{1}{2}$ hours) if it is of sufficient duration. With shorter treatment the effect was less (2 hours) or failed to appear (1 hour). A treatment of the same length that was effective immediately before fertilization ($2\frac{1}{2}$ hours) had no effect when applied 5 to $2\frac{1}{2}$ hours before fertilization.

It was mentioned above that many gastrulae cultured in 8-chloroxanthine possessed an enlarged apical tuft. The problem of whether 8-chloroxanthine has an animalizing action was also studied by rearing isolated animal halves in the same solution. Animal halves are more sensitive to changes in the balance between the animal and vegetal processes than are whole eggs. Text-fig. 4 demonstrates a clear, although not very strong shift of the treated halves in the animal direction compared to the controls.

β -PHENYLLACTIC ACID

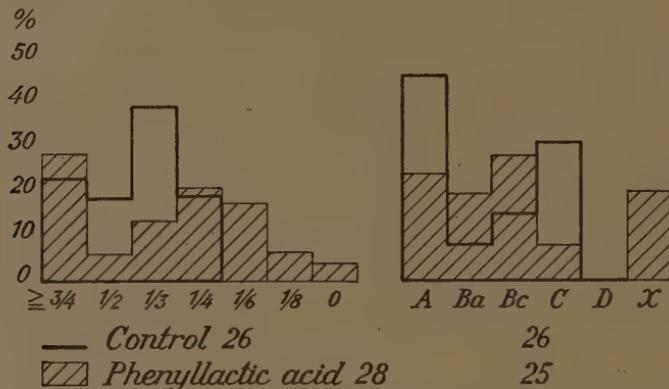
β -phenyllactic acid is an antimetabolite to phenylalanine. It had no effect when the eggs were placed in the solution (0.1 and 0.05 per cent.) after fertilization and left there for only 4 hours, whereas a treatment of 24 hours gave up to 100 per cent. radial larvae (Text-fig. 5). This result was obtained in three series of experiments, but we had no time to determine in which period the eggs are sensitive to this agent.



TEXT-FIG. 5. Radial larvae obtained after treatment with β -phenyllactic acid.

A test with isolated animal halves indicates a more vegetal development on the first day than that of the controls (Text-fig. 6). On the following day this difference is not maintained as far as can be judged from the types A-D. We may notice, however, that on the first day one of the halves had no apical tuft at all and that on the second day 5 halves were blastulae with a rather thin wall without differentiation into pavement epithelium and high columnar epithelium (type X, Text-fig. 6). It may be that this type, to which we return in the section on

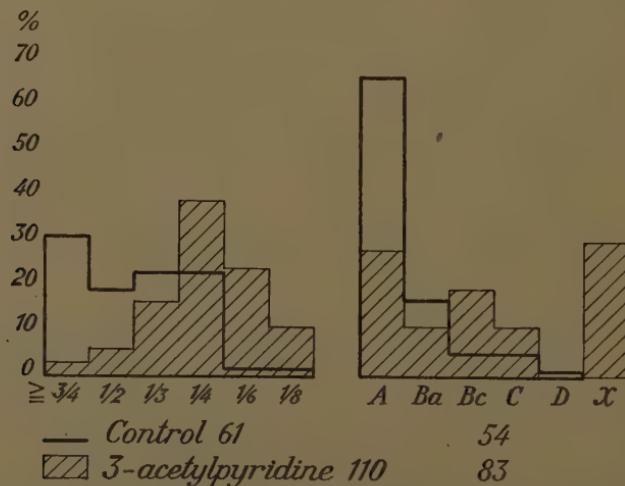
3-acetylpyridine, has been derived from the type $\frac{1}{6}$, $\frac{1}{8}$, and 0 of the first day. If so, the X-halves of the second day represent the most vegetal halves.



TEXT-FIG. 6. Vegetalization of animal halves after treatment with β -phenyllactic acid. For conventions, see legend to Text-fig. 4.

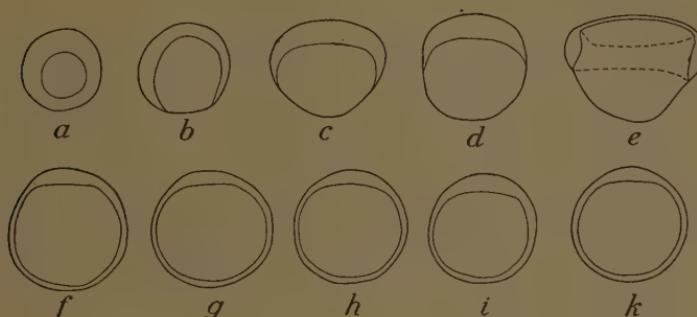
3-ACETYL PYRIDINE

3-acetylpyridine is an antimetabolite to niacin (nicotinic acid amide). It has a stronger vegetalizing effect (Text-fig. 7) than β -phenyllactic acid. Using this antimetabolite we also find a number of animal halves devoid of the usual differentiations of the second day (type X). Some control halves are reproduced in



TEXT-FIG. 7. Vegetalization of animal halves treated with 3-acetylpyridine. For conventions, see legend to Text-fig. 4.

Text-fig. 8. 'a' represents type A in Text-figs. 4, 6, and 7, the whole wall consisting of high columnar epithelium. In b-d part of the wall has given rise to a thin pavement epithelium (types Ba and Bc). In 'e' we find a ciliated band (type C).



TEXT-FIG. 8. a-e: Different types of animal control halves. f-k: Animal halves treated with 3-acetylpyridine.

The lower row in Text-fig. 8 illustrates the halves of the new type (X in Text-fig. 7), a ciliated blastula with a wall of intermediate thickness and no other differentiations. These blastulae looked perfectly healthy. Blastulae in a not very good condition often contain abnormal cells in the interior, but these blastulae were empty. These halves seem to us to represent a new type, arising as a result of an inhibition of normal differentiation.

DISCUSSION

8-chloroxanthine and β -phenyllactic acid interfere with the metabolism of purines and phenylalanine respectively. It may appear surprising that two agents with such a different biochemical point of attack both inhibit the bilateral development. Several observations indicate, however, that the oral side of the germ develops where the metabolism is most intense. The oral side may thus be shifted to any meridian of the egg, e.g. by local intoxication of the egg at an early stage of development with various enzyme poisons (Lindahl, 1932, 1936; Pease, 1941, 1942). It is thus also plausible that a general metabolic depression, induced by various antimetabolites, decreases the physiological dominance of the presumptive oral side so that all meridians differentiate uniformly and a radial larva develops.

The interpretation given above is only reasonable if antimetabolites in general have a 'radializing' effect. This is evidently not the case. The folic acid analogues methopterin, aminopterin, and amethopterin do not induce the formation of radial larvae although they affect the development in other ways. The nicotinic acid analogue 3-acetylpyridine is also ineffective as a 'radializing' agent although

it has a marked vegetalizing effect on animal egg fragments. Several other antimetabolites have also been tested without finding any 'radializing' effect. This suggests that the effect of 8-chloroxanthine and β -phenyllactic acid is due to some property of the molecules different from the strictly antimetabolic one.

One of us (Gustafson & Sävhagen, 1949) has found that anionic detergents such as dodecylsulphate, laurylsulphate, 'Duponol', and 'Texapon' very efficiently induce 'radialization'. There is no reason to believe that these compounds have pronounced antimetabolic properties. Their embryological effect may more likely be attributed to their great surface activity. One may ask if this also holds to some extent for the effects of 8-chloroxanthine and β -phenyllactic acid.

8-chloroxanthine and β -phenyllactic acid undoubtedly have surface active properties. This may be concluded from an examination of the chemical formulae, and from various similarities between the biological and physicochemical effects of these compounds and, for example, the surface active Na-laurylsulphate. The chemical formula of β -phenyllactic acid, with a hydrophobic phenyl group and a strongly negatively charged lactate moiety, suggests that this compound may exhibit a marked surface activity. Since chlorination greatly increases the solubility of xanthine, perhaps 8-chloroxanthine also has increased surface active properties, although it is difficult to decide this question. The foaming of the solutions of β -phenyllactic acid and 8-chloroxanthine also indicates the comparatively high surface activity of these compounds. Furthermore, there is a great similarity between the time-response curve of 8-chloroxanthine (Text-fig. 3) and that obtained with the laurylsulphate in the experiments of Gustafson & Sävhagen (1949, Fig. 2). In addition the cytological effects of 8-chloroxanthine on the sea-urchin egg are similar to these of laurylsulphate, as is described below.

The bilateral development of the sea-urchin egg is probably based on an oral-aboral organization of the unfertilized egg. In the fragile unfertilized egg of *Echinocardium cordatum* this organization is most probably revealed either by a large concavity on the egg surface or even by both one large and one smaller concavity. These are easily induced and sometimes spontaneous (Gustafson, 1952). Similar concavities were demonstrated by Foerster & Örström (1933) in the fertilized egg of *Paracentrotus lividus*, where their relation to the dorso-ventral axis was settled by means of vital staining. It is highly probable that the large concavity in both cases corresponds to the presumptive oral side. The developmental effect of laurylsulphate could be correlated with an abolition of the visible signs of an oral-aboral organization of the unfertilized egg. The formation of concavities is thus effectively reversed or prevented by means of a 0.001 per cent. laurylsulphate solution (Gustafson, 1952) which also causes 'radialization' (Gustafson & Sävhagen, 1949). In solutions active in 'radialization' 8-chloroxanthine also proved to reverse these concavities. This suggests that 8-chloroxanthine and probably also β -phenyllactic acid interfere in the bilateral organization of the egg through the effect of their surface activity rather

than through an antimetabolic interference with biochemical synthesis. A combination of both a structural and a real antimetabolic effect is, of course, possible. The surface-active properties of 8-chloroxanthine and β -phenyllactic acid may in fact cause their accumulation on certain catalytically important surfaces in the cell.

The data presented above support the view that bilateral organization is definitely fixed in the young blastula. This is in good agreement with the detergent experiments of Gustafson & Sävhagen (1949). The process of bilateral organization is apparently most easily disturbed during the hours immediately preceding the 6-hour stage. A 1-hour treatment with 8-chloroxanthine is thus efficient during this period but not at earlier stages of development. However, an effect may be obtained by a treatment during still earlier stages, even several hours before fertilization, provided that the treatment is long enough. This may indicate a lower degree of sensitivity in these early stages, or it may mean that the effect is reversible before the bilateral organization is definitely fixed. The longer the time between the stage of 'bilateral fixation' and the period of treatment, the longer the treatment has to be. A $2\frac{1}{2}$ -hour treatment 5 to $2\frac{1}{2}$ hours before fertilization is thus ineffective, a $2\frac{1}{2}$ -hour treatment between $2\frac{1}{2}$ to 0 hours before fertilization is efficient, and a 1- and sometimes 2-hour treatment before or after fertilization is inefficient.

In addition to their radializing effect, which may be attributed to their surface activity, 8-chloroxanthine and β -phenyllactic acid have, respectively, slight animalizing and vegetalizing effects. These latter effects may quite well be the result of a true antimetabolic action. This is at least probable in the case of 3-acetylpyridine, which caused a vegetalization of animal halves (Text-fig. 6) but did not disturb the bilateral development of whole eggs. The peculiar development involving inhibition of differentiation into the normal types of epithelium which was found in some animal halves (Text-fig. 8) requires further investigation. As 3-acetylpyridine is an antimetabolite to niacin, it may interfere in the metabolism of cozymase and thereby in mitochondrial development, which would in turn effect morphogenesis; cf. Gustafson & Lenicque (1952) and Lenicque, Hörstadius, & Gustafson (1953).

SUMMARY

1. The effect of three antimetabolites, 8-chloroxanthine, β -phenyllactic acid, and 3-acetylpyridine, was studied on the developing sea-urchin egg.
2. 8-chloroxanthine and β -phenyllactic acid very efficiently suppressed the bilateral development of the larvae and induced the formation of radial larvae. The sensitivity of the material in different stages of development was very different, showing an abrupt drop after the 6-hour stage.
3. The results indicate that these antimetabolites interfere in the oral-aboral organization already present in the unfertilized egg. This effect is probably due

to the surface activity of the agents rather than to their antimetabolic properties in a restricted sense.

4. In addition to their effect on the bilateral development, 8-chloroxanthine also causes a slight animalization, β -phenyllactic acid a slight vegetalization. 3-acetylpyridine also vegetalizes and in some cases inhibits differentiation. These effects may be due to strictly antimetabolic action of the three substances.

REFERENCES

- FOERSTER, MARGOT, & ÖRSTRÖM, ÅKE (1933). Observations sur la prédétermination de la partie ventrale dans l'œuf d'oursin. *Trav. Sta. biol. Roscoff*, **11**, 65–83.
- GUSTAFSON, TRYGGVE (1952). Nitrogen metabolism, enzymic activity, and mitochondrial distribution in relation to differentiation in the sea-urchin egg. Almqvist & Wiksell Boktryckeri AB, Uppsala, 1–22.
- & LENICQUE, P. (1952). Studies on mitochondria in the developing sea-urchin egg. *Exp. Cell Res.* **3**, 251–74.
- & SÄVHAGEN, RUT (1949). Studies on the determination of the oral side of the sea-urchin egg. I. The effect of some detergents on the development. *Ark. Zool.* **42A**, No. 10, 1–6.
- LENICQUE, P., HÖRSTADIUS, S., & GUSTAFSON, T. (1953). Change of distribution of mitochondria in animal halves of the sea-urchin eggs by the action of micromeres. *Exp. Cell Res.* **5**, 400–3.
- LINDAHL, P.-E. (1932). Zur experimentellen Analyse der Determination der Dorsoventralachse beim Seeigelkeim. I. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **127**, 300–22.
- (1936). Zur Kenntnis der physiologischen Grundlagen der Determination im Seeigelkeim. *Acta zool., Stockh.* **17**, 179–365.
- PEASE, D. C. (1941). Echinoderm bilateral determination in chemical concentration gradients. I. *J. exp. Zool.* **86**, 381–404.
- (1942a). Idem, II. *J. exp. Zool.* **89**, 329–45.
- (1942b). Idem, III. *J. exp. Zool.* **89**, 347–56.

(Manuscript received 4:iv:54)

Morphogénèse de Bipartition chez *Urocentrum Turbo* (Cilié Holotriché)

par E. FAURÉ-FREMIET¹

Laboratoire d'Embryogénie Comparée, Collège de France, Paris

INTRODUCTION

La différenciation de la ciliature somatique se traduit, chez quelques Ciliés, par une distribution des cils sur des zones annulaires, transversales par rapport à l'axe du corps. Les genres *Cyclotrichium*, *Monodinium*, *Didinium*, *Askenasia*, etc., parmi les Holotriches gymnostomes, sont ainsi caractérisés par la présence d'une ou plusieurs ceintures ciliaires.

Ce type de structure masque, à première vue, la disposition fondamentale de la ciliature somatique en séries longitudinales ou plus exactement en cinéties méridiennes et bipolaires, (Chatton et Lwoff, voir A. Lwoff, 1950). Cependant, chez toutes les formes précitées, l'imprégnation argentique de l'infraciliature met clairement en évidence ce type fondamental d'organisation, et montre comment, au cours de la bipartition, chacune des cinéties longitudinales participe à la néoformation des ceintures ciliaires transversales, par la multiplication localisée de leurs cinétosomes sur un ou plusieurs niveaux bien définis.

La formation de la bouche chez l'individu postérieur, ou opisthe, ne pose pas de problème morphogénétique particulier si, comme chez les Gymnostomes prostomiens dont il vient d'être question, cette bouche est apicale et ne comporte pas de ciliature propre. Il n'en va plus de même chez les Ciliés Holotriches à bouche latérale, et plus spécialement chez les Hyménostomes comportant une ciliature proprement buccale. Chez *Glaucoma* et *Tetrahymena* p. ex., Chatton, Lwoff et leurs collaborateurs ont montré comment l'une des cinéties somatiques ventrales, dite stomatogène, donne naissance, par la multiplication localisée de ses cinétosomes, à un champ granulaire, constituant l'ébauche de la nouvelle bouche, ébauche qui s'organise secondairement par le regroupement des cinétosomes en rangées obliques donnant autant de membranes vibratiles.

L'origine somatique des ciliatures buccales néoformées apparaît comme un processus très général et probablement primitif; mais, chez certaines séries d'Hyménostomes étudiées par H. Mugard (1948), la cinétie stomatogène s'incor-

¹ Author's address: Laboratoire d'Embryogénie Comparée, Collège de France, Place Marcelin Berthelot, Paris 5^e, France.

pore au système ciliaire buccal qui se multiplie dès lors par lui-même, et devient une structure autonome.

L'autonomie du système ciliaire buccal est d'ailleurs connue chez *Paramecium* depuis les observations de R. Hertwig (1889) et de v. Gelei (1934), et l'expérimentation démontre que (V. Tartar, 1941), dans ce cas, la régénération du système buccal à partir des cinéties somatiques est impossible.

La différenciation de la ciliature en zones transversales et l'autonomie du système ciliaire buccal posent quelques problèmes de morphogénèse particuliers. *Urocentrum turbo* est un Holotriché hyménostome qui montre ces deux caractères d'une manière typique; sa structure apparemment spéciale a fait l'objet de nombreuses recherches; cependant, l'application de la technique d'imprégnation selon Chatton et Lwoff permet de préciser, dans un tel cas, les aspects particuliers de la morphogénèse de bipartition.

Les préparations utilisées pour cette étude ont été réalisées par J. Ducornet, M. Gauchery et A. Lejeunne; les figures demi-schématiques ont été exécutées, d'après ces préparations, par M. Tuffrau.

MORPHOLOGIE DE L'UROCENTRUM

La forme de l'*Urocentrum turbo* (Fig. 1) rappelle, à première vue, celle d'un Péridinien, par son étranglement équatorial correspondant à la ceinture et sa gouttière ventrale à peu près longitudinale correspondant au sulcus.

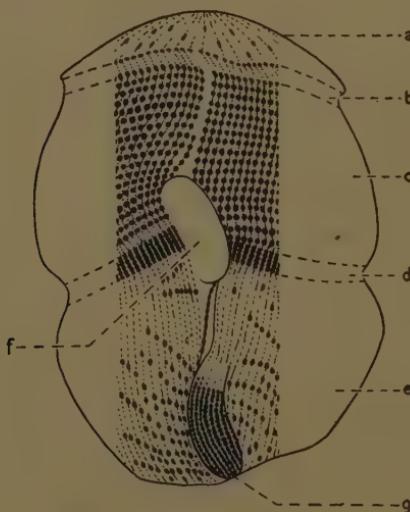


FIG. 1. Ciliature somatique de la face ventrale tracée d'après les imprégnerations à l'argent. Comme sur les figures suivantes, les cinéties et les cinétosomes ne sont dessinés que sur une bande médiane suffisante pour montrer leur disposition caractéristique. *a*, calotte apicale; *b*, sillon transversal antérieur; *c*, fascia; *d*, cingulum; *e*, hémisphère postérieur; *f*, ouverture orale; *g*, scopula.

Le corps de ce Cilié paraît subdivisé en zones transversales, dont B. Klein (1927) a déjà précisé, par des imprégnations à l'argent, les détails caractéristiques. Nous distinguerons successivement: la calotte apicale (Fig. 1, *a*) en forme de cône surbaissé limité par un léger sillon transversal antérieur (*b*); la zone annulaire (*c*), que nous dénommerons *fascia*, dessinée, sur un élargissement du corps, par 18 rangées ciliaires transversales très régulièrement ordonnées en parallèles; un étranglement équatorial (*d*) portant une ceinture ciliaire que nous dénommerons *cingula* et dont l'infraciliature serrée dessine de courtes rangées longitudinales de cinétosomes; l'hémisphère postérieur enfin (*e*) qui, légèrement renflé, montre les corpuscules ciliaires irrégulièrement répartis en rangées obliques, lâches et brisées.

La fascia et la cingula sont interrompues ventralement par le sillon longitudinal dans lequel s'ouvre la fosse buccale (*f*), et qui se prolonge sur l'hémisphère postérieur où il s'incurve vers le pôle antapical en portant la *scopula* (*g*); celle-ci est constituée par des rangées ciliaires longitudinales denses et serrées, au niveau desquelles est secrétée en minces filaments une substance mucilagineuse capable de fixer temporairement l'Infusoire.

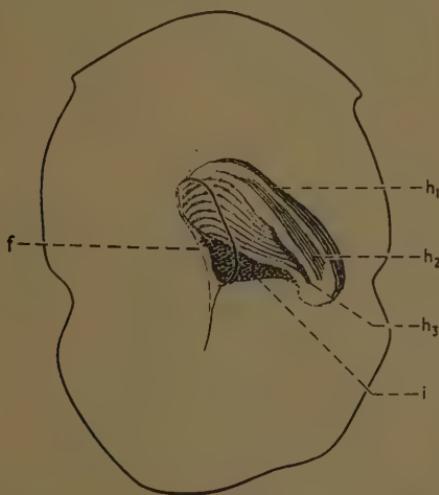


FIG. 2. Ciliature orale imprégnée à l'argent et vue par transparence dans la cavité buccale. h_1 et h_2 , polycinéties correspondant aux *peniculi* de *Paramecium*; h_3 , cinétie composée courte avec les 8 fibrilles latérales dirigées vers l'ouverture buccale *f*; *i*, champ ciliaire.

La ciliature orale de l'*Urocentrum* (Fig. 2) comporte quatre structures distinctes; ce sont d'abord deux polycinéties allongées (h_1 , h_2) sur le plafond de l'infundibulum buccal, puis s'incurvant en direction postérieure vers la bouche proprement dite; constituées chacune par 4 à 5 fines rangées de cinétosomes serrés, ces deux polycinéties semblent correspondre aux deux *peniculi* mis en évidence par

v. Gelei chez *Paramecium*. Vient ensuite une troisième cinétie composée (h_3), courte, obliquement disposée sur le fond de l'infundibulum, et correspondant peut-être à la *membrana quadripartita* de *Paramecium*; à partir de cette cinétie rayonnent 8 fines fibrilles portant quelques cinétosomes dispersés, et dirigées vers l'ouverture orale. La quatrième formation est un champ ciliaire occupant le plancher de l'infundibulum buccal (*i*).

Les imprégnations argentiques obtenues par B. Klein (1927) et mieux encore celles réalisées suivant la technique de Chatton et Lwoff, mettent en évidence la continuité longitudinale des zones ciliaires somatiques différencierées transversalement. En fait la surface du corps est parcourue par un ensemble serré de fibrilles méridiennes bipolaires, légèrement incurvées, surtout à travers la fascia; les cinétosomes sont disposés le long de ces cinétodesmes, mais tandis que leur distribution longitudinale reste évidente sur la cingula, ils occupent, sur la fascia, une série de 18 niveaux exactement définis, comme si des liaisons transversales imposaient l'ordonnancement des granules ciliaires dans un sens perpendiculaire à la direction des cinéties (Fig. 1, *d*). Cette distribution des cinétosomes sur la fascia est si régulière, que Schewiakoff pouvait la systématiser à la fois par un système de lignes annulaires transversales et par un réseau de lignes obliques croisées. B. Klein matérialise les interconnections des cinétosomes par un double système de fibrilles argyrophiles croisées à angle droit, l'un dans les directions longitudinale et transversale, l'autre en directions obliques. Les images données par nos imprégnations ne montrent, avec certitude, que les fibrilles longitudinales correspondant aux cinétodesmes.

LA MORPHOGÉNÈSE DE BIPARTITION. CILIATURE SOMATIQUE

Les nombreux individus en voie de bipartition rencontrés dans nos préparations d'*Urocentrum* permettent d'analyser maintenant les processus morphogénétiques aboutissant, dans ce cas particulier, à la duplication homothétique de chacun des deux systèmes ciliaires somatique et buccal.

C'est au niveau de la cingula que la bipartition prochaine s'annonce par la multiplication des cinétosomes et l'allongement des courtes rangées ciliaires longitudinales (Fig. 3, *d*). En direction apicale, cette multiplication cinétosomienne s'étend aux corpuscules ciliaires des cinq ou six derniers alignements transversaux de la fascia, dont la hauteur se trouve réduite de ce fait au profit de la cingula, dont l'accroissement repousse, sans en modifier la structure, tout l'hémisphère postérieur.

La cingula s'élargit de la sorte jusqu'à occuper un tiers de la hauteur du corps, qui s'est lui-même allongé (Fig. 4). Le sillon équatorial de bipartition commence dès lors à se creuser, séparant la cingula en deux parties inégales, l'antérieure plus courte que la postérieure.

La réorganisation du système ciliaire commence tandis que l'étranglement qui va séparer les deux individus fils se poursuit (Fig. 5).

Chez l'individu antérieur, ou *proter*, la masse protoplasmique s'accroît en

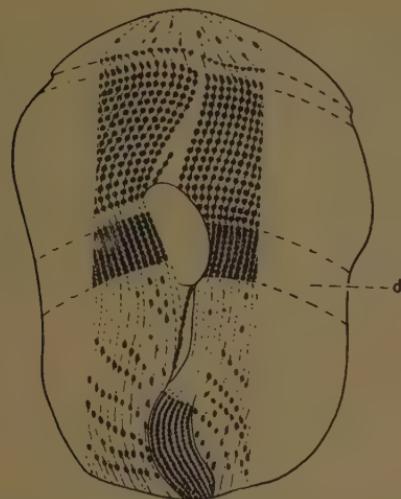


FIG. 3. Premier stade de bipartition montrant l'élargissement de la cingula *d*, dont les cinétosomes se sont multipliés.

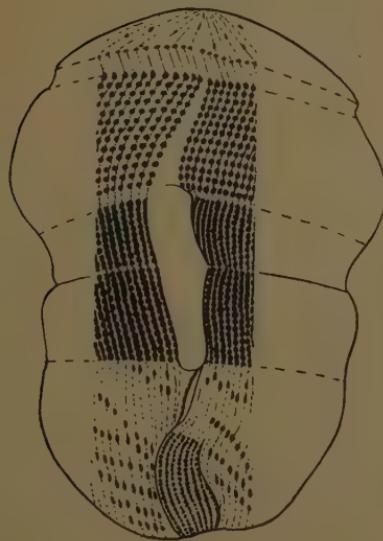


FIG. 4. La cingula s'est encore élargie en absorbant quelques rangées cinétosomiennes de la fascia; l'ouverture buccale est étirée; le sillon équatorial est nettement marqué.

ébauchant, au-dessous du segment cingulaire qui lui est alloué, un nouvel hémisphère postérieur. En même temps ce segment cingulaire diminue rapidement par l'écartement des cinétosomes marginaux; du côté apical ceux-ci s'alignent transversalement de manière à reconstituer les cinq ou six cercles ciliaires de la fascia absorbés par l'accroissement initial de la cingula; du côté antapical, la multiplication des cinétosomes se poursuit localement en prolongeant vers le pôle postérieur les sept rangées cingulaires longitudinales situées immédiatement à gauche de l'ouverture orale, constituant ainsi l'ébauche de la scopula, tandis que partout ailleurs les cinétosomes marginaux, entraînés par l'allongement des cinétodesmes, se dispersent sur des niveaux obliques divers à la surface du nouvel hémisphère antapical.

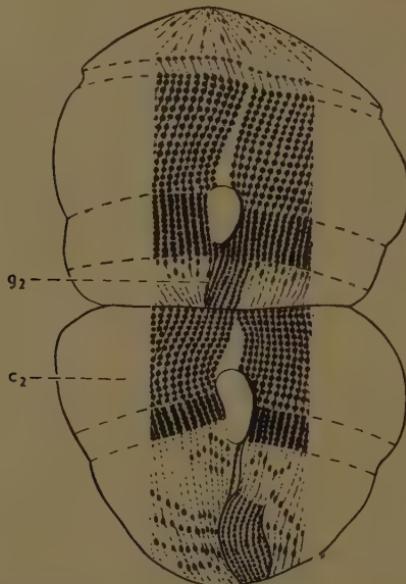


FIG. 5. Stade plus avancé de la bipartition; chez le proter, dont l'hémisphère postérieur commence à s'organiser, la multiplication des cinétosomes de la cingula s'est poursuivie postérieurement sur les quelques cinéties ventrales qui formeront la nouvelle scopula, g_2 . Chez l'opisthe, la nouvelle fascia c_2 s'organise par l'écartement en direction antérieure et l'ordonnancement des cinétosomes cingulaires.

Chez l'individu postérieur (Fig. 5), ou *opisthe*, l'hémisphère antapical reste inchangé et la réorganisation se manifeste dans toute la zone antérieure du large segment cingulaire opisthien; tandis que les cinétodesmes s'allongent en direction antérieure, vers le nouveau pôle apical, les cinétosomes de la cingula s'écartent les uns des autres et s'immobilisent en s'ordonnant sur 18 niveaux annulaires transversaux de manière à constituer la nouvelle fascia.

Le modelage des deux individus se termine avant même qu'ils ne se séparent; chez le proter, l'accroissement de l'hémisphère antapical disjoint la scopula et la cingula (Fig. 6), et achève de disperser les cinétosomes marginaux sur une série complexe de lignes obliques brisées. Chez l'opisthe, la calotte apicale s'organise au-dessus de la fascia néoformée, tandis que celle-ci s'isole apparemment de la cingula qui lui a donné naissance.

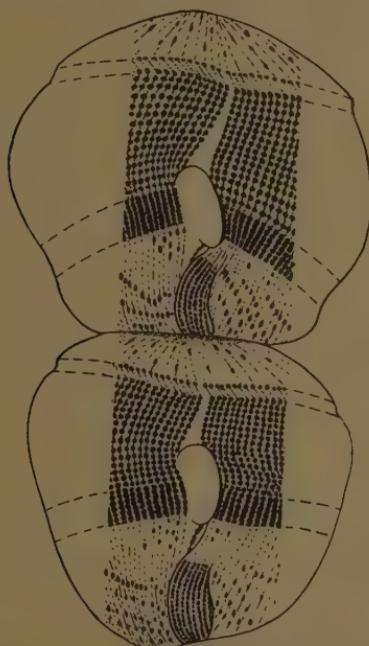


FIG. 6. Stade précédent la séparation des deux nouveaux individus; le modelage de l'hémisphère postérieur du proter et de la région antérieure de l'opisthe, est presque terminé.

LA MORPHOGÉNÈSE DE BIPARTITION. CILIATURE BUCCALE

La bipartition du système ciliaire buccal se déroule parallèlement à la bipartition du système somatique mais de manière indépendante. Le champ ciliaire situé sur le plancher de l'infundibulum (Fig. 2, *i*) s'accroît par multiplication des cinétosomes, puis il commence à s'organiser par le rassemblement des granules ciliaires en quatre travées, parallèles, de direction oblique, et légèrement incurvées postérieurement (Fig. 7). A ce moment, l'accroissement médian de la longueur du corps, marqué par l'élargissement de la cingula, étire longitudinalement l'ouverture et la cavité buccale, tandis qu'il écarte les unes des autres, sur le fond de cette cavité, les quatre travées granuleuses constituant déjà l'ébauche de la nouvelle ciliature orale: h'_1 , h'_2 , h'_3 , et h'_4 .

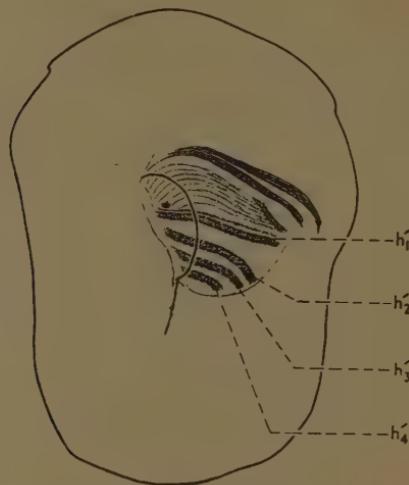


FIG. 7. Division de l'appareil buccal; le champ ciliaire de la bouche primitive (Fig. 2, *i*) s'est accru et subdivisé en quatre zones obliques: h'_1 , h'_2 , h'_3 , et h'_4 , constituant l'ébauche de la ciliature orale de l'opisthe.

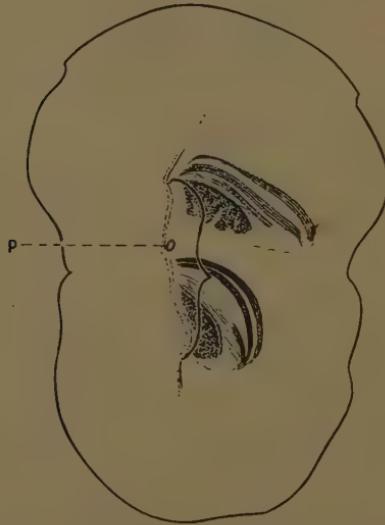


FIG. 8. Organisation de la ciliature orale de l'opisthe, qui s'éloigne de celle du proter, tandis que la cavité buccale et son ouverture restent encore communes à l'une et à l'autre. Le pore de la vacuole contractile du proter, *p*, est formé.

La différenciation de cette ébauche se poursuit dans une large cavité commune aux deux systèmes ciliaires buccaux, l'ancien et le nouveau (Fig. 7). Les trois travées granulaires supérieures, se transforment par l'ordonnancement régulier de leurs cinétosomes, en autant de polycinéties; les deux premières, qui sont les plus longues, s'incurvent fortement et deviennent les peniculi de la bouche opisthienne; la troisième se raccourcit et devient l'origine des 8 fibrilles radiaires; la quatrième, enfin se résout en un nouveau champ granulaire.

Le champ granulaire de la bouche primitive, qui sera celle du proter, reconstitue son champ granulaire aux dépens, semble-t-il, d'une rangée de cinétosomes isolée de l'ébauche buccale opisthienne.

Les deux ciliatures buccales sont séparées lorsque l'approfondissement du sillon équatorial de bipartition coupe en deux la cavité et l'ouverture orale qui leur étaient communes (Fig. 8). Elles s'écartent ensuite l'une de l'autre, après fermeture de leurs cavités respectives, à mesure que l'hémisphère antapical du proter et la calotte apicale de l'opisthe acquièrent leur forme et leur masse définitives (Fig. 9).

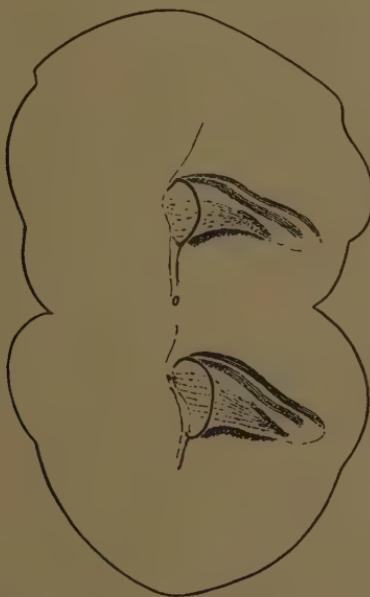


FIG. 9. Séparation des deux cavités buccales.

L'étude de la bipartition des structures ciliaires buccales chez *Paramecium*, *Frontonia*, et *Disematostoma* (Fauré-Fremiet, 1948, et observations non publiées) montre un processus étroitement comparable à celui qui vient d'être décrit chez *Urocentrum*; la bouche de l'opisthe se formant, en contact étroit avec la bouche

primitive qui reste celle du proter, aux dépens d'un champ granulaire formé immédiatement à droite de la membrana quadripartita ou de son équivalent morphologique.

On remarquera que l'autonomie du système ciliaire buccal se retrouve chez d'autres Holotriches, dans la famille des Lembidae p. ex., (Mugard, 1947, 1948), et qu'elle est la règle chez les Hétérotriches (Chatton & Seguela, 1940), les Oligotriches (Fauré-Fremiet, 1954), et les Périthriches (Chatton & Villeneuve, 1937). On notera d'autre part que la différenciation quadripartite de l'ébauche buccale opisthienne rappelle le type tétrahyménien tel que l'a défini Furgason (1940), mais ce fait demande à être discuté de plus près en considérant la morphologie comparée des Ciliés Hyménostomes.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La disposition particulière de la ciliature somatique chez *Urocentrum turbo* matérialise en quelque sorte la zone médiane que les expériences conduites chez *Paramecium* et d'autres Ciliés permettent de définir avec Calkins (1911) sous le nom de 'zone de division'.

La zone annulaire équatoriale ou cingula, représente en fait, chez *Urocentrum* en période d'interscission, une zone indifférenciée et une réserve de cinétosomes dont le pouvoir de multiplication permet d'assurer la morphogénèse complétiue imposée par la bipartition. Achevée par la mise en place des cinétosomes suivant un plan spécifiquement ordonné, cette morphogénèse complétiue est comparable à un processus de régénération; elle reconstitue une demi ciliature postérieure sur le corps du proter et une demi ciliature antérieure sur le corps de l'opisthe.

La duplication de la ciliature buccale s'effectue sans aucune participation des éléments somatiques, et comporte en fait la néogénèse d'une ciliature complète qui sera celle de l'opisthe. Cette néogénèse s'effectue à partir du champ ciliaire inférieur de la bouche initiale, qui restera celle du proter; comme la cingula, ce champ peut être considéré comme une zone indifférenciée et une réserve de cinétosomes dont la multiplication permet à la fois de reconstituer le champ de la bouche antérieure et de former l'ébauche de la bouche opisthienne. La néogénèse buccale est achevée, comme la morphogénèse complétiue somatique, par l'ordonnancement des cinétosomes suivant un plan spécifiquement défini.

La morphologie d'un Cilié est dominée par les caractères de son infraciliature; la forme spécifique est définie par un réseau de cinéties caractéristique; les mécanismes plus ou moins complexes de la bipartition réalisent l'organisation de deux réseaux de cinéties *équivalents*, au sens géométrique et cristallographique de ce mot, et homogènes, ce terme précisant que toutes les cinéties conservent même sens et même polarité. La surface du Cilié est seule impliquée en ce qui regarde ces caractères et ces mécanismes. Les mécanismes de la bipartition (comme ceux de la régénération par ailleurs) conduisent dès lors à la notion de champ morphogénétique cortical, et le réseau de cinéties caractéristique fournit en quelque sorte une image objective de ce champ cortical.

Cette image serait-elle l'expression d'une organisation ultramicroscopique du cortex cellulaire dont elle refléterait, par sa complexité, l'anisotropie profonde? ou bien serait-elle imposée par le jeu des interactions développées dans un ensemble de cinétosomes eux-mêmes anisotropes?

Ces questions ont été évoquées par E. Fauré-Fremiet, 1948 *a et b*, 1950, 1953; A. Lwoff, 1950; B. Ephrussi, 1952. Les données morphologiques et morphogénétiques apportées par l'étude de l'*Urocentrum* conduisant à les poser à nouveau, sans permettre encore de les discuter plus avant.

RÉSUMÉ

Les diverses espèces de Ciliés sont caractérisées par la disposition relative des rangées ciliaires méridionales, ou cinéties somatiques, et des rangées ciliaires orales ou péristomiques.

La bipartition assure la réalisation de deux systèmes ciliaires homothétiques, l'un définissant l'individu antérieur ou proter, l'autre l'individu postérieur ou opisthe.

Urocentrum turbo est caractérisé par la disposition secondaire des cinétosomes somatiques sur des niveaux annulaires transversaux dessinant une large ceinture antérieure ou fascia et une étroite ceinture équatoriale ou cingula.

Au premier stade de la bipartition, la cingula s'élargit par la multiplication de ses cinétosomes; la distribution ordonnée de ces derniers le long des cinéties somatiques réalise, ensuite, la morphogénèse de la partie postérieure du proter et de la partie antérieure de l'opisthe.

La cingula de l'*Urocentrum* est une zone morphogène dont la structure matérialise la notion expérimentale de 'zone de division', introduite par Calkins.

La ciliature orale constitue un système autonome avec sa propre zone morphogène.

SUMMARY

1. Different species of Ciliates are characterized by the relative positions of the meridional ciliary bands (somatic kineties) and the oral or peristomial ciliary bands. Division sees the formation of two homothetic ciliary systems, one defining the anterior individual (proter) and the other the posterior individual (opisthe).

2. *Urocentrum turbo* is characterized by the secondary arrangement of its somatic kinetosomes on transverse annular lines forming a wide anterior girdle or fascia and a narrow equatorial girdle or cingula.

3. At the first stage of division the cingula grows by the multiplication of its kinetosomes; the distribution of these along the somatic kineties then completes the morphogenesis of the proter and opisthe.

4. The cingula of *Urocentrum* is a morphogenic zone which conforms in its actual structure to the provisional idea of a 'division zone' introduced by Calkins.

5. The oral ciliation constitutes an autonomous system with its own morphogenic zone.

TRAVAUX CITÉS

- CALKINS, G. N. (1911). Effects produced by cutting Paramecium cells. *Biol. Bull. Wood's Hole*, **21**, 36-72.
- CHATTON, E., & VILLENEUVE, S. (1937). La division de la bouche et la formation du péristome chez les Périrhèches (*Cyclochata astropectinis* n. sp.). Leur continuité génétique immédiate. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **204**, 538-1.
- & SEGUELA, J. (1940). La continuité génétique des formations ciliaires chez les Ciliés hypotriches. Le cinétome et l'argyrome au cours de la division. *Bull. biol.* **74**, 1-94.
- EPHRUSSI, B. (1952). *Nucleo-Cytoplasmic Relations in Micro-Organisms*. Oxford: Clarendon Press.
- FAURÉ-FREMIET, E. (1948a). Les mécanismes de la morphogénèse chez les Ciliés. *Folia biotheor., Leiden*, no. 3, 25-58.
- (1948b). Doublets homopoliens et régulation morphogénétique chez le Cilié *Leucophrys patula*. *Arch. Anat. micr.* **37**, 183-203.
- (1948c). Morphologie comparée des Ciliés holotriches Trichostomata et Hymenostomata. *XIII^e Congrès International de Zoologie*, 215-16.
- (1950a). Morphologie comparée et systématique des Ciliés. *Bull. Soc. zool. Fr.* **75**, 109-22.
- (1950b). Mécanismes de la morphogénèse chez quelques Ciliés Gymnostomés Hypostomiens. *Arch. Anat. micr.* **39**, 1-14.
- (1953). La bipartition énantiotope chez les Ciliés Oligotriches. *Arch. Anat. micr.* **42**, 209-25.
- FURGASON, W. H. (1940). The significant cystostomal pattern of the 'Glaucoma-Colpidium group', and a proposed new genus and species, *Tetrahymena geleai*. *Arch. Protistenk.* **94**, 224-66.
- GELEI, J. v. (1934). Der feinere Bau des Cytopharynx von Paramecium und seine systematische Bedeutung. *Arch. Protistenk.* **82**, 331-62.
- HERTWIG, R. (1889). Ueber die Conjugation der Infusorien. *Abh. bayer. Akad. Wiss.* **17**, 1-83.
- KLEIN, BR. M. (1927). Die Silberliniensysteme der Ciliaten. Ihr Verhalten während Teilung und Conjugation, neue Silberbilder, Nachträge. *Arch. Protistenk.* **58**, 55-142.
- LWOFF, A. (1950). *Problems of Morphogenesis in Ciliates*. New York: J. Wiley & Sons.
- MUGARD, H. (1947). Division et morphogénèse chez les Philasteridae et les Lembidae. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **225**, 141.
- (1948). Contribution à l'étude des Infusoires Hyménostomes histiophages. *Ann. Sci. nat., Zool.* 11^e S., **10**, 173-268.
- TARTAR, V. (1938). *Regeneration in the Genus Paramecium*. Dissertation. Yale University.
- (1941). Intracellular patterns; facts and principles concerning patterns exhibited in the morphogenesis and regeneration of ciliate Protozoa. Third Symp. on Development and Growth. *Growth*, **5**, 21-40.

(Manuscript received 22 : iii : 54)

The Inducing Action of the Bone-marrow of the Guinea-pig after Alcohol and Heat Treatment in Implantation and Explantation Experiments with *Embryos of Triturus*

by SULO TOIVONEN¹

From the Zoological Laboratory of the University of Helsinki

WITH TWO PLATES

INTRODUCTION

SINCE Schreiber (1950) has assumed that the agent inducing bone and cartilaginous tissue in the experiments of Levander and his collaborators (Levander, 1938; Annersten, 1940; Bertelsen, 1944; Lacroix, 1945; Levander, 1949; Willestaedt, Levander, & Hult, 1950) is similar, as regards its chemical nature, to the spinal inducing agent in my experiments (Toivonen, 1940, 1949 *a* and *b*, 1950), I implanted alcohol-treated bone-marrow of the guinea-pig into the gastrulae of *Triturus*. The results of these experiments, which I have reported earlier in this journal (Toivonen, 1953), showed that the inducing action of this inductor is to be regarded as solely mesodermal. Hence the 'spinal' agent earlier postulated can be subdivided into a component inducing neural structures and a component inducing mesoderm, of which only the mesoderm-inducing agent is included in the bone-marrow tissue.

According to Chuang's (1939, 1940) experimental results—later confirmed by Okada (1948), by Rotmann (Toivonen, 1950, p. 52), and by myself (1953)—the mesoderm-inducing activity is abolished by heating the inductor. Last spring, therefore, I continued the experiments with alcohol-denatured bone-marrow, treating it for 10 minutes in hot water at 80°–90° C. before using it as inductor in implantation experiments.

When using whole gastrulae in such experiments there is reason to believe that the fields of the host may have an effect of their own on the nature of the structures induced. At the end of the last operating season, therefore, I also made two series of control experiments using the sandwich method, with inductors either (*a*) of alcohol-treated bone-marrow, or (*b*) of the same tissue after treatment in hot water.

¹ Author's address: Zoological Laboratory, University of Helsinki, P.-Rautatiek. 13, Helsinki, Finland.

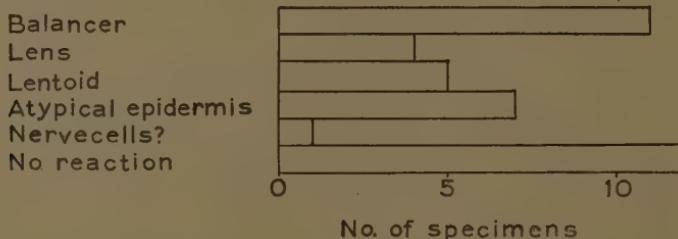
MATERIAL AND METHODS

Gastrulae of *Triturus vulgaris* were used as the reaction material in all the experiments. The implantations were carried out using Holtfreter saline with sodium sulphadiazine added as a bactericidal agent. In explantations the saline was buffered with phosphates (Deuchar, 1953), which proved to be very suitable. Embryos and explants were usually cultured for 2 weeks. Specimens were fixed in Bouin's fluid and first stained in bulk with borax-carmine; the sections were further stained with Picroblau-schwarz.

RESULTS

1. *Implantation experiments*

Alcohol-treated bone-marrow after heat treatment as inductor. The series comprises altogether 33 cases. A detailed analysis of the structures induced is given in Text-fig. 1. It will be seen that, as was to be expected, the previous mesoderm-inducing activity of the alcohol-treated bone-marrow has now entirely disappeared, and the inductor has now induced epidermal differentiations only,



TEXT-FIG. 1. Diagram showing the frequency of the various differentiations induced by heat-treated bone-marrow in the thirty-three embryos analysed.

such as balancers, lenses, and lentoids, i.e. it has had a weak archencephalic action. In the majority of the experimental animals the inductor has exerted no perceptible action at all or the reaction of the host has been merely an atypical epidermal proliferation. In one case more darkly staining cells were found, which might perhaps be regarded as nerve cells. In Plate 1 (figs. A-D) are to be seen some examples of the differentiations which have been found in this series.

2. *Explantation experiments*

A. *Alcohol-treated bone-marrow as inductor.* This series comprises a few experiments only, but the structures differentiated resemble each other in all the explants which were cultured long enough, so that it is possible to draw some conclusions.

On external examination of the living explants, tail-like formations, limb rudiments, and melanophores were to be seen.

Microscopical preparations showed that in this series all the differentiations were very similar to those that occurred in the corresponding series with whole

gastrulae (Toivonen, 1953). Ectomesodermal mesenchyme was to be seen in the fins induced. The mesenchyme often also contained melanophores. There were also to be found structures which in normogenesis would develop from the endomesoderm, such as myotomes, notochord, pronephric tubules, and forelimb rudiments in varying ratios. A proctodaeum with anal opening has also been noticed. The similarity to the corresponding series with whole gastrulae is astonishing.

As an example of this series, one explant will be illustrated which contains all the characteristic structures induced in the whole series (Plate 2, figs. A-C); all the differentiations which occurred in the corresponding series with the whole gastrulae are present, and nothing additional to them: neither neural structures nor epidermal differentiations with the exception of the normal epidermis and the proctodaeum.

If the last-mentioned formation is to be regarded as secondarily induced by the induced mesoderm, as I have postulated earlier (Toivonen, 1953), all the induced structures are manifestations of the mesoderm-inducing activity of the inductor. I also wish to lay stress on the fact that this activity has been a very strong one, because there are also present notochord and myotomes, and because the whole explant is differentiated, no part of it having remained as undetermined atypical epidermis.

B. *Alcohol-treated bone-marrow after heat treatment as inductor.* This series, too, only contains a few cases. But in my opinion they present a very good picture of the activity of this inductor.

External examination of the living explants in itself indicated that the activity of the inductor was very much weaker than in the previous series. Only in a part of the explant was differentiation always determined, the rest remaining as atypical loose epidermis where cell proliferation continued. Externally definable structures such as appeared in the previous series were not to be seen, nor were there melanophores.

Microscopical examination confirmed the fact that the activity of the inductor was very weak. Only in the immediate neighbourhood of the inductor was normal epidermis to be observed; elsewhere the epidermis was abnormal. Moreover, the lentoids were a true epidermal differentiation. In some cases more or less abnormal and doubtful balancers were also formed. No signs of mesodermal structures were to be observed.

As an example of the differentiations of the series, a photograph of a section through a typical case is to be seen in Plate 1, fig. E.

DISCUSSION

The results of the experiments reported above confirm my early postulation (Toivonen, 1953) that the agent inducing mesoderm is independent of the agents inducing neural structures. Nor can it be thought, in my opinion, that the mesoderm-inducing agent is changed by the heat treatment into an agent inducing

neural structures, as was assumed by Chuang (1939, 1940), whose view was also adopted by Okada (1948). In my experiments the effect of the inductor was too weak after heat treatment to allow one to suppose that the previously very strong mesodermal agent was responsible. In my opinion, the correct interpretation of these results, when they are compared with the previous series (Toivonen, 1953), is that the mesodermal agent occurring in both the series with alcohol-treated bone-marrow as inductor had such a strong effect that other active substances in the inductor were not able to express their effect in the reactive material. When heat treatment has rendered the mesodermal agent inactive, these other agents are enabled to exert their effect.

There is reason to stress that the mesoderm induced by the bone-marrow is derived in normogenesis from two different sources: firstly, it may be axial mesoderm, i.e. endomesoderm derived from the mesoblast proper; and secondly, it may be ectomesenchyme, i.e. ectomesoderm derived from the neural crest. Thus the explantation experiments show that, as compared with normogenesis, bone-marrow induces the axial mesoderm from foreign tissue, i.e. ectoderm, whilst it induces ectomesodermal elements from ectoderm as in normogenesis.

As regards the chemical nature of the mesodermal agent, naturally only hypotheses can be put forward. What has previously been presumed to be characteristic of the 'spinal' agent evidently applies to it, however. It is of large molecular size, denatured and inactivated even after a short heat treatment, is soluble in petroleum ether, and, as has recently been shown by Engländer, Johnen, & Vahs (1953), it is also inactivated by prolonged alcohol treatment. All these facts indicate that the mesoderm-inducing agent is a thermolabile protein, as postulated earlier for the 'spinal' agent (Lehmann, 1945; Toivonen, 1949 *a* and *b*, 1950).

As mentioned above, my experiments with bone-marrow were prompted by those of Levander and his collaborators, who found that bone-marrow extracts injected into the rectus femoris of the rabbit caused there the production of bone and cartilage cells. It has been assumed that bone regeneration is regulated by an agent liberated from the bone after fracture. This agent affects the reactive cells and causes them to develop into bone cells. The opinion is also expressed that in the transplantation of bone the transplant itself is cytolysed and a regeneration blastema is produced from the neighbouring tissue. It must be remembered that the healing of the epidermis in large wound surfaces can be markedly quickened by transplanting on it narrow strips of epidermis. In Levander's opinion (1941, 1951) the transplanted epidermis would be cytolysed, but an agent is liberated from the cells, which promotes regeneration of epidermis. Teir and his collaborators have prepared extracts from the epidermis of the rat, which, when injected into the coelom of the rat, have increased mitotic activity. As a result of prolonged injections they have in certain cases been able to produce tumours too (Teir, Voutilainen, Kiljunen, & Ravanti, 1952). These examples indicate that in differentiated tissues of adults agents are present which

are tissue-specific, maintaining and regulating the normal growth and regeneration of the tissues.

These experiments of mine with bone-marrow lend further support to Levan's (1945) and Schreiber's (1950) view that the tissue-specific agents of the adult may possibly be the very same agents that cause induced structures when brought in contact with ectoderm capable of differentiation. In this way the problem of the substances active in the regulation of embryonic development in the vertebrates would be one with the problem of the substances taking part in the regulation of the regeneration process, and the investigation of the problem would gain a further impetus, since something is already known about each separately.

SUMMARY

1. In previous implantation experiments (Toivonen, 1953) the alcohol-treated bone-marrow of the guinea-pig had proved to be a very specific inductor of mesodermal structures.

2. The same material has been treated in addition for 10 minutes in hot water at 80°–90° C. and then used as inductor in implantation experiments with whole gastrulae of *Triturus vulgaris*. The results of this experiment show that the previous mesodermal activity of the inductor has completely disappeared; it now induces purely epidermal formations, such as lenses, lentoids, and balancers.

3. In explantation experiments with the 'sandwich' method the alcohol-treated bone-marrow tissue has induced the same mesodermal structures as in the previous series with whole gastrulae.

4. Heat-treated bone-marrow has induced in the 'sandwiches' normal epidermis in the neighbourhood of the inductor, and in addition lentoids and balancer-like formations.

5. Because the previously very strong mesodermal activity of the inductor has disappeared as a result of the heat treatment and the treated inductor has only been able to exert a weak epidermal activity, it is assumed that the heat treatment has inactivated the independent, thermolabile mesodermal agent, and the epidermal agents, which are present in the inductor, have consequently been enabled to exert their own effect.

6. The chemical nature of the mesoderm-inducing agent is discussed; and also the similarity of the tissue-specific agents which presumably regulate regeneration in adult vertebrates and the embryonic inducing agent.

Financial support for this work has been received from the Niilo Helander Foundation, for which I wish to express my gratitude.

REFERENCES

- ANNERSTEN, S. (1940). Experimentelle Untersuchungen über die Osteogenese und die Biochemie des Fractuscallsus. *Acta chir. scand.* **84**, Suppl. 60, 1–181.
BERTELSEN, A. (1944). Experimental investigation into post-foetal osteogenesis. *Acta orthopaed. scand.* **15**, 139–81.
CHUANG, H.-H. (1939). Induktionsleistungen von frischen und gekochten Organteilen (Niere,

- Leber) nach ihrer Verpflanzung in Explantate und verschiedene Wirtsregionen von Triton-keimen. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **139**, 556–638.
- CHUANG, H.-H. (1940). Weitere Versuche über die Veränderung der Induktionsleistungen von gekochten Organteilen. *Roux Arch. EntwMech. Organ.* **140**, 25–38.
- DEUCHAR, E. M. (1953). The regional properties of amphibian organizer tissue after disaggregation of its cells in alkali. *J. exp. Biol.* **30**, 18–43.
- ENGLÄNDER, H., JOHNEN, A. G., & VAHS, W. (1953). Untersuchungen zur Klärung der Leistungsspezifität verschiedener abnormer Induktoren bei der Embryonalentwicklung der Urodelen. *Experientia* **9**, 100–1.
- LACROIX, P. (1945). Recent investigation of the growth of bone. *Nature, Lond.* **156**, 576.
- LEHMANN, F. E. (1945). *Einführung in die physiologische Embryologie*. Basel: Verlag Birkhauser.
- LEVANDER, G. (1938). A study of bone regeneration. *Surg. Gynec. Obstet.* **67**, 705–14.
- (1941). Om hudepitlets regeneratio. *Nord. med.* **10**, 1489–500.
- (1945). Tissue induction. *Nature, Lond.* **155**, 148–9.
- (1949). On tissue induction. *Acta path. microbiol. scand.* **26**, 113–41.
- (1951). On the epithelium-regeneration in the healing of wounds. *Acta chir. scand.* **100**, 637–49.
- OKADA, Y. K. (1948). Induction of notochord by frog ventral skin and the organizing effect of such a notochord. *Proc. imp. Acad. Japan*, **10**, 22–29.
- SCHREIBER, B. (1950). L'induzione ossea nel quadro dei fenomeni di induzione fra tessuti adulti. *Boll. Zool.* **17**, 257–304.
- TEIR, H., VOUTILAINEN, A., KILJUNEN, A., & RAVANTI, K. (1952). Induction of neoplasm by intra-peritoneal injections of cell-suspensions of normal tissue. *Acta path. microbiol. scand.* **93**, Suppl. 93–97.
- TOIVONEN, S. (1940). Über die Leistungsspezifität der abnormen Induktoren im Implantatversuch bei Triton. *Ann. Acad. Sci. fenn., A*, **55**, No. 6, 1–150.
- (1949a). Die Induktionswirkung von leistungsspezifischen heterogenen Induktoren nach Behandlung mit verschiedenen Eingriffen (Temperatur, Lösungsmitteln u. dgl. m.) im Implantationsversuch bei Triton. *Arch. zool.-bot. fenn. Vanamo*, **4**, 28–34.
- (1949b). Zur Frage der Leistungsspezifität abnormer Induktoren. *Experientia*, **5**, 323.
- (1950). Stoffliche Induktoren. *Rev. suisse Zool.* **57**, Suppl. 1, 41–50.
- (1953). Bone-marrow of the guinea-pig as a mesodermal inductor in implantation experiments with embryos of Triturus. *J. Embryol. exp. Morph.* **1**, 97–104.
- WILLESTAEDT, H., LEVANDER, G., & HULT, L. (1950). Studies in osteogenesis. *Acta orthopaed. scand.* **19**, 419–32.

EXPLANATION OF PLATES

PLATE 1

FIG. A. Section through an embryo with a lens induced by heat-treated bone-marrow.

FIG. B. Section through an embryo with a balancer and a lens, both induced by heat-treated bone-marrow.

FIG. C. Section through an embryo in which a lens with two fibre centres and a balancer have been induced by heat-treated bone-marrow.

FIG. D. Section through an embryo with a balancer induced by heat-treated bone-marrow.

FIG. E. The heat-treated bone-marrow has induced normal epidermis and a lentoid in an epidermal explant in the neighbourhood of the inductor; elsewhere the epidermis has remained atypical.

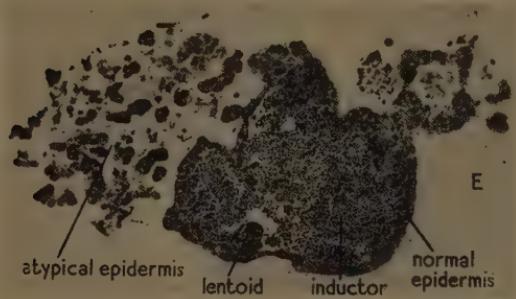
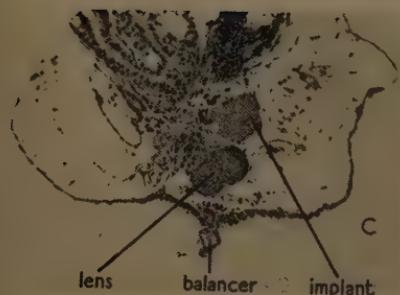
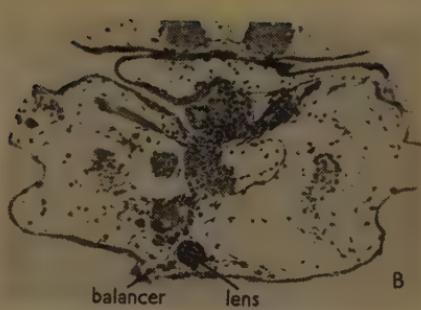
PLATE 2

FIG. A. The alcohol-treated bone-marrow has induced in an epidermal explant four forelimb rudiments and a tail-like formation.

FIG. B. A section through the same explant where the inductor has induced notochord, myotomes, pronephric tubules, a fin containing ectomesenchyme and a proctodaeum with anal opening.

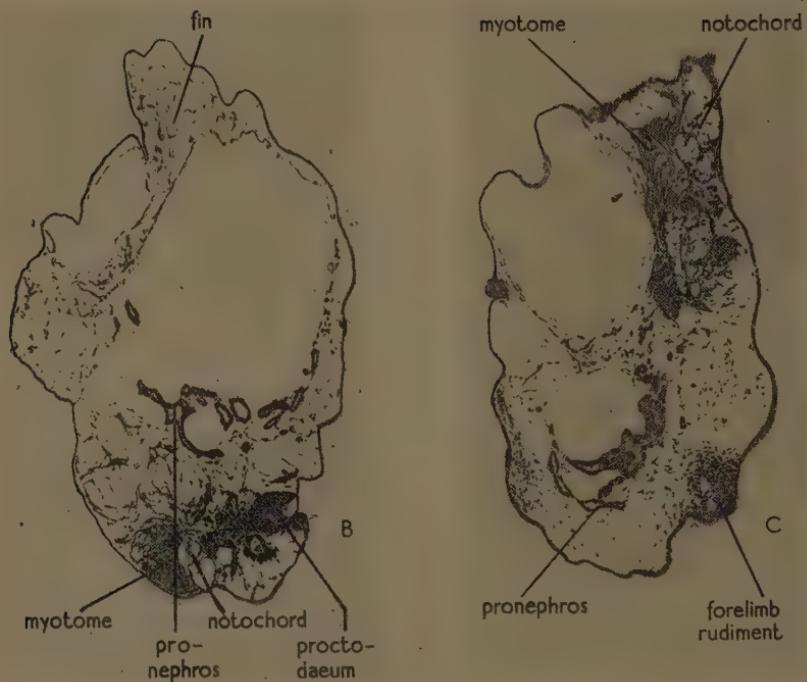
FIG. C. Another section through the same explant with notochord, myotomes, pronephros, and a forelimb rudiment.

(Manuscript received 6:iv:54)



S. TOIVONEN

Plate I



S. TOIVONEN

Plate 2

Nouvelles recherches expérimentales sur les origines de la lignée reproductrice chez la Grenouille rousse

par LOUIS BOOUNOURÉ, RÉGINE AUBRY et
MARIE-LOUISE HUCK¹

Institut de Zoologie et de Biologie Générale de la Faculté des Sciences de Strasbourg

AVEC DEUX PLANCHES

AUSSI simple, aussi facile à réaliser qu'il soit, aussi clairement qu'il semble parler dans un sens univoque, il n'est point de fait expérimental qui ne prête à controverse au nom de certaines vues théoriques discordantes, ou qui n'appelle des recherches complémentaires, soit quant aux moyens d'en mieux assurer le résultat, soit quant aux conséquences et aux enseignements qui peuvent sortir de sa réalisation imparfaite.

L'un de nous ayant réussi en 1935 à effectuer une stérilisation de la Grenouille rousse par l'action des rayons ultraviolets sur le pôle inférieur de l'œuf, cette expérience est venue corroborer de la façon la plus précise l'existence, dans cet œuf encore indivis, d'un 'déterminant germinal' localisé, notion où conduisait également l'étude préalable de la lignée reproductrice, telle qu'on peut la suivre, grâce à certains aspects cytologiques de ses cellules, en remontant à des stades de plus en plus jeunes du développement (Bounoure, 1935, 1937, 1939).

A la suite de nouvelles expériences, nous sommes amenés à envisager les trois points suivants:

- 1°. La notion de 'déterminant germinal' et sa valeur.
- 2°. Recherche d'une technique assurant une stérilisation totale.
- 3°. La régulation du germe consécutive à une stérilisation subtotalle.

I. LA NOTION DE 'DÉTERMINANT GERMINAL' ET SA VALEUR

On sait que l'existence d'une différentiation spéciale du cytoplasme ovulaire entraînant la ségrégation précoce de la lignée reproductrice, a été systématisée par les recherches de Hegner (1914) dans la notion du *déterminant germinal*: sous cette notion sont venus se ranger tous les exemples de corpuscules ou de plasmes liés à la différentiation du germe, le *polares Plasma* de *Miastor* (Kahle,

¹ Authors' address: Institut de Zoologie et de Biologie Générale, Faculté des Sciences, Rue de l'Université, Strasbourg, France.

1908), le *Keimbahnplasma* de *Chironomus* (Hasper, 1911), les *granules polaires* de *Drosophila* (Huettner, 1923; Geigy, 1931), le *pôle disc* de *Calligrapha* et de *Leptinotarsa* (Hegner, 1909), l'*oosome* de *Copidosoma* (Silvestri, 1914), le *Keimbahnkörper* de *Polyphemus* (Kuhn, 1931), les *ectosomes* de *Cyclops* et de *Diaptomus* (Häcker, 1937; Amma, 1911), le 'corps particulier' (*besondere Körper*) de *Sagitta* (Elpatiewsky, 1910; Buchner, 1910), les *ectosomes* d'*Asplanchna* (Nachtwей, 1925), le *cytoplasme germinal* de *Rana* (Bounoure, 1931, 1939). Sans doute une étude comparative manque, qui aurait pu seule mettre en évidence l'homologie foncière de toutes ces formations; mais des analogies certaines les rapprochent: même existence précoce au pôle inférieur de l'œuf, même ségrégation dans une lignée cellulaire spéciale par le jeu différentiel des divisions de segmentation, même rôle déterminant à l'égard des cellules germinales, rôle démontré par l'observation embryologique et confirmé dans plusieurs cas précis par l'expérience.

Dans un remarquable travail expérimental, Nieuwkoop (1946, 1950) découvre l'origine des cellules germinales primordiales des Urodèles (*Triturus*, *Ambystoma*) dans les lèvres ventrales et latéro-ventrales de la gastrula, territoire pré-somptif du mésoderme des lames latérales; ces cellules représentent, parmi les cellules mésodermiques banals, des éléments de *nature spéciale*, pré-déterminés, c'est à dire aptes à se différencier dans le sens germinal sous une action inductive émanant de l'endoderme caudal. Si le lieu d'origine du germen est ici mésodermique, et non endodermique comme chez les Anoures, Nieuwkoop considère que cette différence 'may be not so fundamental a phenomenon as the *special nature* of these cells represents'; or cet état pré-déterminé 'must be based on a cytoplasmic differentiation', et le savant embryologiste d'Utrecht n'exclut pas l'idée que 'this cytoplasmic differentiation may be represented in Urodeles too in the form of a "cytoplasme germinal" found in Anurans' (1950, p. 264).

Si l'*Ascaris* constitue un autre exemple, non moins probant, de la ségrégation très précoce du germen, celle-ci présente chez cet animal, suivant les recherches classiques de Boveri et de son école, quelques traits particuliers, à savoir la diminution chromatique qui affecte les noyaux de la lignée somatique, et, d'autre part, l'absence apparente d'une différenciation polaire de l'œuf comme dans les autres cas de 'déterminants germinaux'. Boveri s'est efforcé jadis de montrer, par une pénétrante analyse expérimentale, que, chez l'*Ascaris* également, la ségrégation du germen a pour base une constitution cytoplasmique régionale, c'est à dire, en somme, un déterminant germinal invisible, qui préserve l'un des blastomères initiaux de la diminution chromatique et l'oriente ainsi vers une destinée germinale; il attribuait en effet à l'œuf une constitution hétéropolaire, c'est à dire un gradient animal-végétatif, qui a été nié par Von Ubisch (1943), ce dernier auteur plaçant le facteur de détermination germinale, non au pôle végétatif de l'œuf, mais dans la zone sous-équatoriale.

Plus récemment Pasteels (1948) a apporté des précisions nouvelles sur les conditions et les facteurs cytologiques de la différenciation somato-germinale

chez ce même Nématode. Étudiant au début du développement la structure cytochimique de l'œuf en division et des premiers blastomères, il voit, à la télophase de la première mitose, apparaître, au niveau de chacun des pôles, une calotte hyaline ou 'cape polaire', dans laquelle se concentrent les granules ribonucléiques de chacun des deux premiers blastomères (Fig. 1, *a*): dès ce moment on remarque que la cape polaire de la cellule germinale *P* se distingue de celle du blastomère somatique *AB* par sa *densité*, ses *granules plus gros*, ses rapports plus étroits avec

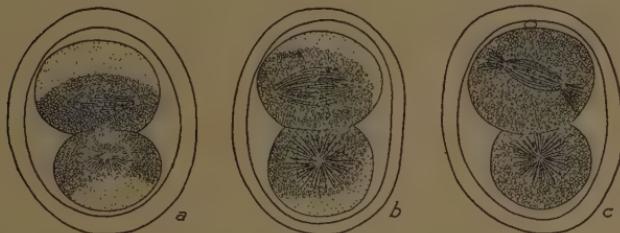


FIG. 1. Segmentation chez l'Ascaris; stade à 2 blastomères, l'un 'animal' *AB*, l'autre 'végétatif' *P*; *a*, capes polaires figurées en pointillé; *b*, déplacement des capes polaires; *c*, orientation des fuseaux de la division suivante. (D'après Pasteels, 1948.)

le cortex. Ces capes semblent se former en relation avec l'aster télophasique, et elles s'effacent à l'intercinèse, mais, avant de disparaître, elles se disposent obliquement par rapport à l'axe de polarité (Fig. 1, *b*), déplacement qui paraît correspondre dans chaque blastomère à l'obliquité du fuseau de la division suivante (Fig. 1, *c*); rappelons en effet que les fuseaux de segmentation qui conduisent du stade 2 au stade 4 et que l'on considérait autrefois, l'un comme horizontal (dans *AB*), l'autre comme vertical (dans *P*), sont en réalité obliques, avec une orientation différente, le plan contenant l'axe de l'un étant perpendiculaire au plan où se trouve l'axe de l'autre.

Les mêmes phénomènes se répètent dans les cycles suivants: la cape polaire des cellules successives contenant la lignée germinale accentue chaque fois sa teneur en granules ribonucléiques, si bien que dans la cellule germinale définitive ces granules, 'toujours denses, sont beaucoup plus abondants que dans les cellules somatiques'. Ainsi se réalise dans les éléments de la lignée reproductrice un 'état particulier, acquis progressivement par une succession de divisions différencielles'; c'est cet état qui empêcherait notamment la diminution chromatique des noyaux dans cette lignée.

Ces importantes observations sur la segmentation chez l'Ascaris amènent leur auteur à remarquer que le mécanisme de la différenciation somato-germinale,

chez ce Ver, 'réside dans un élément du cytoplasme' à savoir 'la cape polaire ribonucléique', et que ces faits 'ressemblent singulièrement à l'évolution de la lignée génitale chez les Cyclops (Amma, 1911) et les Rotifères (Nachtwey, 1925)'. Tout esprit non prévenu pourrait donc penser que la différentiation plasmatische du germe chez l'Ascaris relève, comme chez les autres animaux, de la notion de 'déterminant germinal'. Or tel n'est pas l'avis de l'éminent embryologiste de Bruxelles: il combat au contraire ladite notion, lui reproche d'être trop 'statique', et la condamne comme impliquant l'idée inacceptable de 'localisation germinale'. Et 'plutôt qu'un *plasma germinatif* préexistant et même permanent', il préfère admettre un 'état germinal' de la cellule. Soulignons en passant avec quelle facilité, — d'ailleurs entièrement justifiée, — les biologistes acceptent la permanence des gènes nucléaires et la transmission corpusculaire de l'hérédité individuelle, et à quel point ils répugnent à admettre l'existence continue d'une base matérielle cytoplasmique expliquant l'hérédité spécifique; cette hérédité n'est-elle pas cependant l'évidence première, la plus constante, la plus frappante, qui ressort de tout développement embryonnaire? mais sans doute, en raison de cette évidence même, 'l'habitude en ôte l'étrangeté'.

Cette opposition systématique peut-elle invoquer ici des raisons positives? Ce ne peut être des raisons d'ordre cytochimique, car chez la plupart des animaux précédemment étudiés il s'agit, comme chez l'Ascaris, de corpuscules ou de plasmes basophiles; bien plus, chez le Coléoptère *Acanthoscelides obtectus*, Mulnard (1947) a reconnu que le plasma polaire comporte aussi une accumulation de granules ribonucléiques, et Pasteels regarde comme 'extrêmement probable' qu'il en est partout le même. Rien n'oblige à penser qu'à cet égard le cas des Amphibiens fasse exception; au moment où il a été étudié par l'un de nous, les méthodes de détection cyto-chimique des acides nucléiques n'existaient pas, et seules les particules figurées du cytoplasme, mitochondries et formations golgiennes, pouvaient servir à un rapprochement et à une tentative d'interprétation. Du plasma germinal de la Grenouille, une analyse micro-chimique reste encore à faire; apparemment très complexe, il renferme sans doute à côté de mitochondries, des éléments basophiles, comme l'indique sa coloration par le bleu de Volkonsky (violet-azur II), qui se superpose de façon très marquée à la coloration rose de la fuchsine; il n'est pas absurde de supposer que soit les mitochondries, soit le fond *ergastoplasmique* qui les englobe, soit ces deux constituants à la fois, sont porteurs d'acide ribonucléique, et l'absorption de l'U.V. par le pôle inférieur de l'œuf, siège de ce plasma, semble plaider dans ce sens. D'ailleurs le R.N.A., présent dans tout cytoplasme d'une manière générale, ne saurait devenir un critérium des déterminants germinaux que par un certain degré de concentration susceptible seulement d'appréciation arbitraire, ou par son association avec d'autres constituants chimiques. Et même si l'on voit dans sa présence un signe caractéristique des cellules germinales originelles, ce n'est point évidemment par là qu'il pourrait servir d'argument contre la notion de déterminant germinal.

Qu'est-ce qui fait alors l'intérêt de la différentiation plasmatique du germen chez l'Ascaris et lui donne un aspect aberrant? C'est qu'elle ne remonte pas à l'œuf indivis, qu'il n'y a pas de 'plasma germinatif' préexistant ou permanent et que l'«état germinal» propre aux cellules à destinée reproductrice, est 'acquis' à la suite de segmentations différencielles suivant une modalité bradygénétique'. En un mot, la lignée germinale naît par une *épigénèse*, dont la bradygénèse n'est qu'une variété tardive. Si nous comprenons bien la pensée du savant auteur belge, c'est au nom de la théorie de l'épigénèse que la notion d'«état germinal» doit être substituée à celle de 'déterminant germinal' localisé.

'Localisation germinale', on ne peut douter que ces deux mots ne soient en horreur aux embryologistes: ils évoquent, à la faveur d'une confusion injustifiée, un relent de la préformation, le temps de Swammerdam et des ovulistes; toute localisation germinale fait 'vieux jeu'; l'épigénèse seule rend compte de tout; une interprétation purement épigénétique, voilà qui est 'up to date'.

Il est bien certain que tout développement est une suite de néoformations et de différenciations, dont aucune ne préexiste comme telle; mais l'épigénèse ne les crée pas *ex nihilo*; elle a une base matérielle dans l'œuf; celui-ci, en l'absence de toute différentiation au sens organogénique, n'en possède pas moins une structure hétérogène, où les divers constituants, depuis les éléments figurés les plus visibles jusqu'aux macromolécules de nucléoprotéides, ont une certaine répartition spatiale, c'est à dire une localisation déterminée, et peuvent même former dans certains cas des *territoires* reconnaissables. En outre cet œuf n'est pas un commencement absolu; sa constitution spécifique, comme ses 'localisations germinales' quand il en possède, sont, elles aussi, des 'états acquis', nés des processus 'épigénétiques' de la longue période organisatrice de l'ovogénèse; de sorte qu'entre les plages ou formations ovulaires dites 'prédéterminées' et les 'ségrégats' ou différenciations qui naissent ultérieurement dans l'embryon, il n'y a pas de différence essentielle: matériel organo-formateur ou 'déterminant' de l'œuf, ségrégat embryonnaire à potentialités limitées, inducteur localisé, chacun est à la fois effet de l'épigénèse et préparant du futur, déterminé et déterminant, causé et finalisé. Ce n'est que dans les préparations *mortes* de l'embryologiste, où la durée mouvante du développement est découpée en instantanés définitivement arrêtés, qu'une formation 'localisée' peut paraître *statique* et être qualifiée comme telle; mais dans l'embryon vivant, tout est dynamique, toute 'localisation' matérielle est l'engrenage de réalisations ultérieures et entre comme telle dans leur mécanisme épigénétique; ainsi tout marche vers cette *mosaïque* de plus en plus fine de ségrégations et de différenciations, les unes *tachygénétiques*, les autres *bradygénétiques*, qui trouvent leur terme dans l'organisme achevé.

Une telle vue des phénomènes de l'ontogénèse paraîtra peut-être trop éclectique. Elle nous permet au moins d'échapper à l'obsédante querelle de la prédétermination et de l'épigénèse, comme à la nécessité de choisir entre le 'déterminant germinal' et l'«état germinal»; pour nous, en effet, ces deux notions seulement ne s'opposent pas, mais sont au contraire corrélatives. Et Nieuwkoop,

comme on l'a vu plus haut, admet très bien que chez les Urodèles l'état pré-déterminé des premiers éléments du germe puisse être lié à la présence d'un cytoplasme germinal encore hypothétique.

En tout cas on ne peut douter que le déterminant germinal, chez maintes espèces, n'apparaisse sous une forme localisée dans l'œuf *individus*; et Mulnard (1947) a précisé, chez un Coléoptère, que le 'plasme caudal' formé de granules ribonucléiques, 'existe déjà dans l'ovule en équilibre de première maturation, prélevé dans l'oviducte'; chez l'Ascaris, en revanche, il s'actualise seulement au cours des divisions différentielles de la segmentation: dans l'immense diversité des phénomènes de la vie, que pèse cette minime différence d'ordre chronologique, au regard de l'importance de ce facteur essentiel? Qu'il soit, dans la plupart des cas, et en un sens littéral plutôt que théorique, une 'localisation' de l'œuf, nous avons peine à croire que ce puisse être là un fait de scandale pour l'embryologiste.

La ségrégation d'une lignée privilégiée, vouée à 'l'état germinal', est une épigénèse, qui, comme toujours, exige un minimum de conditions matérielles. Cette condition minima, l'expérience qui consiste à détruire le *déterminant germinal* (Hegner, Geigy, Bounoure), prouve de façon décisive que c'est bien en ce déterminant qu'elle réside. Peut-être même ce seul *fait scientifique* (au sens de Claude Bernard) rend-il superflue toute la discussion qui précède.

II. RECHERCHE D'UNE TECHNIQUE DE STÉRILISATION ASSURANT SA RÉUSSITE TOTALE

La stérilisation de la Grenouille par irradiation U.V. du pôle inférieur de l'œuf est de réalisation à la fois aisée et difficile suivant le résultat qu'on en attend.

S'il s'agit de vérifier la présence d'un constituant cytoplasmique polaire et son rôle essentiel dans la détermination de la lignée germinale, l'expérience donne *toujours* un résultat amplement convaincant, pour des doses et des temps d'irradiation compris même entre des limites relativement larges: l'abolition des éléments germinaux, toujours considérable, se révèle au simple examen anatomique, chez les animaux à l'âge de la métamorphose, par les dimensions fortement réduites des gonades juvéniles; et leur étude histologique montre une chute énorme du nombre des gonocytes: les numérations effectuées dès les premières expériences en 1937, permettaient 'd'estimer à 90% au minimum le ravage subi par la lignée germinale dans les cas les moins réussis'. Même en opérant sans précautions spéciales, il n'est pas rare d'obtenir des individus où le nombre des gonocytes tombe, pour l'ensemble des deux gonades, à quelques dizaines, ou *même à quelques unités*. Parmi les animaux étudiés en 1937, il s'en trouvait un 'qui ne contenait que deux gonocytes, et un autre qui n'en avait plus qu'un seul: chez tous deux l'une des gonades était complètement dépourvue de cellules germinales' (Bounoure, 1939, p. 168).

S'agissant d'une expérience dont le résultat est régulièrement d'une ampleur

frappante, on pouvait penser qu'elle permettrait d'obtenir à coup sûr une stérilisation totale de l'animal irradié, et par conséquent des individus strictement réduits à leur soma depuis leur toute première origine, condition qui ouvrirait d'intéressantes possibilités pour d'autres études. Or on ne peut attendre de ce mode de castration précoce qu'il réalise avec certitude une destruction radicale de la lignée reproductrice: parmi tous les animaux issus d'œufs irradiés en 1937, il n'en était aucun qui n'ait permis à une observation minutieuse de découvrir quelques gonocytes, — ne fût-ce qu'un seul, — dans les gonades dépeuplées; du hasard seul semblait dépendre l'étendue de la destruction. Une nouvelle série d'essais, effectués en variant les conditions d'irradiation, permettait d'annoncer en 1950 l'obtention, sur environ 300 œufs, de 9 petites Grenouilles complètement privées de gonocytes (Bounoure, 1950, p. 250). Le résultat cherché n'était donc pas hors de toute possibilité d'atteinte, mais faute de voir apparaître la condition vraiment favorable, la réussite paraissait ne comporter qu'une faible probabilité.

Il s'agissait de reprendre d'une façon systématique et plus perfectionnée l'expérience primitive, pour améliorer le pourcentage des stérilisations totales: c'est en ce sens qu'ont été faits les essais suivants (R. Aubry, 1953).

La technique a consisté à utiliser une lampe Gallois, type S-500, sans écran, dont l'activité, pour les œufs placés à 20 cm. du foyer, est d'environ 800 finsens par minute; l'irradiation était pratiquée sur des œufs soigneusement dégangués et placés sous une faible couche d'eau dans une petite boîte rectangulaire à paroi de quartz; le faisceau de rayons, dirigé de bas en haut, frappait directement les œufs à travers cette paroi; la durée de l'irradiation était de 1 mn., 1 mn. 30 s., ou 2 mn. suivant les lots.

Une première série d'essais a visé simplement à établir, à l'aide d'un nombre suffisant d'animaux, le pourcentage des réussites obtenues dans les conditions les plus simples, c'est à dire sans artifice spécial dans la manière d'exposer les œufs à la source de rayons U.V. Le résultat fournit un terme de comparaison pour le deuxième type d'expérience.

Dans cette deuxième série, on a cherché à déprimer les deux pôles de l'œuf à l'aide d'une légère pression, pour que le pôle inférieur touche le fond du récipient

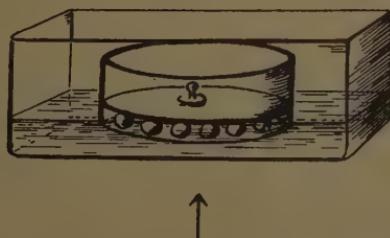


FIG. 2. Dispositif d'irradiation des œufs, les pôles légèrement déprimés.

de quartz par une calotte plane assez étendue et non par un simple point de tangence. Il faut remarquer en effet qu'un coin d'eau se glisse tout autour de ce

point sous la région polaire, quand on laisse à l'oeuf sa forme naturelle parfaitement sphérique; et on est amené à supposer que le déterminant polaire est ainsi protégé dans une certaine mesure par ce coussin d'eau contre l'action destructrice des rayons U.V. Pour obtenir l'aplatissement du pôle inférieur, les œufs, chaque fois au nombre de 20, étaient placés sur le fond de quartz à l'intérieur d'une cellule de verre cylindrique de 20 mm. de diamètre, puis recouverts d'une fine lamelle de verre circulaire, affleurant à la surface de l'eau et surchargée d'un poids de 1 gr. (Fig. 2 dans le texte); le poids total de la surcharge, réparti sur les 20 œufs, était de 1.85 gr.

Les résultats de ces deux séries d'expériences se traduisent par les chiffres suivants (Tableau 1), relevés respectivement sur 52 et 45 animaux parvenus à la métamorphose et dont les gonades ont été étudiées sur coupes séries pour la numération des gonocytes.

TABLEAU 1

Conditions d'irradiation	Nombre d'animaux développés	Nombre d'animaux partiellement stérilisés			Stérilisation totale	
		plus de 30 gonocytes	10 à 30 gonocytes	1 à 10 gonocytes	Nombre d'animaux	Pourcentage
Pôle infér. sans déform.	52	4	6	26	16	31
Pôle infér. aplati	45	2	7	9	27	60

Si les œufs laissés dans leur forme sphérique naturelle ont donné jusqu'à 31 pour cent d'animaux *complètement stérilisés*, pourcentage dont les résultats antérieurs étaient restés très éloignés, ce chiffre n'atteint pas encore le tiers des animaux soumis à l'expérience, et l'on ne peut donc attendre de la méthode la plus simple d'irradiation qu'une faible probabilité de réussite totale.

Mais, appliquée à des œufs dont le pôle inférieur déprimé subit plus largement et plus également sans doute l'action des rayons U.V., l'irradiation fournit un pourcentage de stérilisations totales qui est presque le double du précédent. Ce résultat paraît bien vérifier la validité de notre hypothèse, à savoir que le plasme germinal occupe l'étendue d'une calotte polaire assez large, qui ne subit dans son entier l'action des rayons U.V. qu'une fois déprimée et appliquée à plat contre le support de quartz traversé par le rayonnement. On peut même inférer que dans le cas d'une destruction seulement partielle, c'est la partie périphérique de cette calotte polaire qui est vraisemblablement le mieux épargnée, grâce au coin d'eau engagé sous elle et dont la hauteur va croissant à partir du pôle même.

Ce qui confirme cette manière de voir, c'est que pour certains des œufs à pôle déprimé, la stérilisation est inégalement poussée dans les deux gonades symétriques des animaux métamorphosés; voici, par exemple, les chiffres nettement inégaux qui, chez 6 individus, ont été relevés dans l'une et l'autre gonade (le chiffre le plus élevé, tantôt à droite, tantôt à gauche, étant énoncé le premier):

$$24 + 12, 22 + 7, 25 + 5, 7 + 1, 13 + 1, 12 + 0.$$

Cette dissymétrie résulte de toute évidence de la position légèrement oblique que prend parfois l'œuf immobilisé et comprimé entre le fond du récipient et la lamelle couvrante. Au contraire, quand l'œuf est libre et que son axe polaire s'oriente verticalement sous l'effet de la gravité, le plasme germinal du pôle inférieur subit dans tous ses secteurs une destruction sensiblement égale, et il n'y a pas de raison pour que les gonocytes subsistants ne soient pas répartis d'une façon approximativement symétrique entre les deux moitiés de l'organisme.

Quoiqu'il en soit, l'artifice technique qui consiste à soumettre à une légère compression l'œuf à irradier, s'il améliore le pourcentage des stérilisations totales, n'exclut pas de nouvelles recherches en vue d'une méthode opératoire encore plus favorable. Ces recherches ont donné lieu à une troisième série d'expériences.

Il était naturel de se demander si, dans les conditions où l'œuf est irradié, il n'entre pas un élément chronologique variable, qui fait que tous les essais ne sont pas exactement comparables. Entre l'entrée du spermatozoïde et l'apparition du premier sillon de segmentation, la période d'indivision, pour l'œuf de Grenouille, dure de 3 à 4 heures suivant la température, et ce laps de temps correspond à une activité interne en vertu de laquelle l'œuf ne reste pas constamment identique à lui-même. Le résultat de l'irradiation ne dépendrait-il pas, dans une certaine mesure, du moment précis où elle est appliquée au cours de la période d'indivision ?

La réponse a été demandée à des œufs qui ont été tous également soumis à une compression légère, suivant la technique décrite à la page 251; ils ont été répartis en deux catégories expérimentales:

- (a) les uns ont été irradiés relativement tôt, soit approximativement vers le milieu de la période d'indivision, c'est à dire 1 heure $\frac{1}{2}$ ou 2 heures après la ponte suivant la température;
- (b) les autres ont été irradiés juste avant l'apparition du premier sillon de segmentation.

Précisons que dans tous les cas il s'agit d'œufs obtenus à partir de couples de grenouilles tenus en observation; dans ces conditions parfaitement naturelles, tous les œufs d'une même ponte spontanée sont fécondés au même instant.

Les résultats sont résumés dans le tableau 2.

TABLEAU 2

Irradiation	Nombre d'œufs irradiés	Stérilisations partielles	Stérilisation totale	
			Nombre	Pourcentage
Relativement précoce	14	9	5	36
Précédant immédiatement la 1 ^{ère} division	31	9	22	71

Il ressort de ces chiffres que l'on a d'autant plus de chances de détruire *totalelement* le déterminant germinal que l'on opère plus près du moment où va apparaître le premier sillon de segmentation. Comment peut-on concevoir la raison de ce fait expérimental ?

Dire qu'à ce moment-là le déterminant germinal offre une plus grande sensibilité à l'égard des rayons U.V., ce ne serait guère que se payer de mots tant que l'on ne possède aucune lumière sur les transformations physico-chimiques du cytoplasme ovulaire pendant la période où se prépare la première division. En revanche on recourt à une hypothèse simple et logiquement assez satisfaisante, en supposant que le plasme germinal, assez largement dispersé tout d'abord dans la calotte polaire inférieure, se concentre au voisinage même du pôle vers la fin de la période d'indivision, de telle sorte que cette localisation plus étroite et plus dense l'expose alors à une destruction plus complète par l'ultra-violet.

Cette hypothèse peut-elle invoquer le bénéfice de quelque vraisemblance? Oui, si l'on relie la concentration polaire présumée du plasme germinal à son sort ultérieur: il a été signalé en effet qu'au moment où débute le cloisonnement de l'œuf, on voit ce déterminant 's'infiltrer vers le haut, aux stades à 2, 4, 8 blastomères, le long des cloisons verticales qui séparent ces derniers' (Bounoure, 1939, p. 153); il est fort possible que ce mouvement d'ascension très précoce soit précédé et préparé, immédiatement avant la première division de l'œuf, par une concentration du déterminant tout près du pôle où vont s'entrecroiser les deux premières cloisons méridiennes; ce n'est pas le premier exemple où l'on voit, dans l'ontogénèse, deux processus s'enchaîner de telle façon que le premier prend un caractère *proleptique* par rapport au suivant.

On ne peut envisager cette concentration polaire présumée du cytoplasme germinal de *Rana*, sans être tenté de la comparer à celle des granules ribonucléiques au pôle mitotique de l'œuf d'*Ascaris*, telle que Pasteels l'a décrite; sans doute ne peut-il s'agir d'une homologie parfaite, tout au moins en ce qui concerne les rapports de ce phénomène avec la figure de division de l'œuf, car chez la grenouille de tels rapports n'existent pas. Il est vrai que chez le Nématode, on ne discerne pas clairement la relation de dépendance des capes à granules et des fuseaux de division: si c'est le pôle du premier fuseau qui détermine l'agglomération des granules, c'est à dire la formation de la cape, d'où vient le déplacement de la cape qui réglera l'obliquité du fuseau à la division suivante?; l'on s'étonne un peu de voir cape et fuseau échanger aussi rapidement les rôles mutuels d'effet et de cause. C'est pourquoi il reste possible de suggérer, à titre de simple rapprochement, que chez le Nématode et le Vertébré les matériaux cellulaires qui serviront à la ségrégation du germe subissent une concentration semblable à un moment identique, de simples contingences d'ordre topographique permettant chez le Ver des relations avec l'appareil mitotique, qui n'existent pas chez la grenouille. Au surplus, de telles considérations et tentatives de rapprochement sont peut-être entièrement vaines, en raison de l'immense écart qui sépare les deux phylums des Nématodes et des Vertébrés.

Quoi qu'il en soit, nos essais font apparaître la possibilité d'améliorer notablement le pourcentage des réussites totales dans la stérilisation de la grenouille *ab ovo* par les rayons U.V. Mais nous ne sommes pas encore en possession d'une méthode détruisant radicalement dans tous les cas la lignée reproductrice; il y

faudrait sans doute des moyens plus puissants, tels que les rayons X. Mais on va voir qu'une destruction *partielle* de la lignée germinale n'est pas dépourvue de tout intérêt, car elle ménage des chances de reconstitution de cette lignée; si bien qu'en définitive l'expérience en question ne peut donner, quant à la destruction du germen, que tout ou rien.

III. LA RÉGULATION DU GERΜEN APRÈS STÉRILISATION SUBTOTALE

Il est bien connu qu'une expérience où la réussite n'est que partielle, est souvent riche en faits instructifs, qui ne peuvent apparaître dans le cas où l'altération de la cause supprime totalement l'effet.

On peut se demander ce qu'il advient de la lignée germinale, lorsque l'irradiation a produit une destruction subtotale du déterminant polaire: la minime quantité subsistante de ce déterminant entraîne-t-elle la formation d'un nombre proportionnellement réduit de gonocytes primaires, lequel ne subit plus de variation jusque dans les gonades de l'animal en métamorphose? — ou bien le déterminant germinal épargné est-il la source, eu égard à sa masse très minime, de plus de gonocytes qu'il n'en aurait déterminé dans une ontogénèse normale, et cela grâce à une activité mitotique prolongée des gonocytes initiaux, tendant à une restauration de la lignée reproductrice? On va voir que c'est en faveur de cette dernière hypothèse que plaignent les faits reconnus chez les individus ayant subi une stérilisation incomplète.¹

Dans le développement normal, la lignée reproductrice se constitue, à partir des blastomères qui ont hérité d'une portion du déterminant germinal, dans une phase relativement précoce; la multiplication des premiers gonocytes, si elle se prolonge un peu plus dans l'ébauche du testicule que dans celle de l'ovaire, a pris fin depuis longtemps, dans les deux sexes, au moment de la métamorphose: chez les très jeunes Grenouilles on ne trouve pratiquement plus de cellules germinales en division dans les gonades.

S'il y a une régénération effective du germen chez les animaux issus d'œufs irradiés, c'est en comparant leurs gonades avec celles des individus normaux, que l'on pourra en trouver la preuve dans des mitoses de multiplication en nombre inhabituel à ce stade. Il y a donc lieu de fixer ce terme de comparaison en étudiant la structure des glandes génitales normales.

Etude des organes témoins. — Dans les testicules et les ovaires normaux, de très nombreuses cellules germinales sont aux stades de préméiose et généralement au stade leptotène, avec ça et là des figures en bouquet caractéristiques. Toutefois chez les jeunes femelles l'ovogénèse, dans certaines des chambres

¹ L'absence de tout pouvoir de régulation pour la lignée germinale' (Bounoue, 1939, p. 203) était à comprendre dans le sens d'une non-régénération de cette lignée par des éléments d'origine somatique, dits gonocytes secondaires. Toutefois l'assertion était présentée d'une façon ambiguë, et nous sommes heureux que la présente étude fasse la lumière sur l'existence, dans la lignée des gonocytes primaires, d'un pouvoir propre d'auto-régulation.

ovariennes, est plus avancée, avec ovocytes en grand accroissement, pourvus d'une grosse vésicule germinative. En tout cas aucun de ces aspects nucléaires ne saurait être confondu avec des mitoses de multiplication.

Chez les mâles, les mitoses multiplicatives, sans être fréquentes, sont un peu moins rares que dans les ovaires: si la plupart des éléments germinaux sont à l'état de spermatocytes, on trouve ça et là quelques spermatogonies en division; de telles mitoses représentent sans doute un reste de la multiplication des premiers gonocytes embryonnaires; on peut en voir un exemple sur la Fig. A de la Planche 1 (bord gauche du testicule, figure d'anaphase).

Le nombre de ces divisions est toujours très restreint; nous considérons comme un cas limite celui d'un mâle chez lequel, compte tenu d'une erreur possible de 2 ou 3 unités, nous avons dénombré 30 figures de division: par rapport au nombre total de gonocytes, qui, pour les deux testicules, peut être évalué à 3.500 environ, le chiffre ci-dessus indiqué représente seulement 0·8 pour cent. Mais ce pourcentage est un maximum, et dans le sexe mâle le nombre des mitoses est toujours nettement au-dessous de ce chiffre; on peut admettre que l'activité mitotique moyenne, par rapport au nombre des gonocytes, est d'environ 0·5 pour cent.

Chez les témoins de sexe femelle, en raison de l'avance relative de l'ovogénèse, les divisions de gonocytes sont encore plus rares, eu égard au nombre élevé de ces éléments. Les Fig. B et C (Planche 1) montrent, la première une division anaphasique sur le bord gauche de l'organe, la deuxième deux mitoses juxtaposées du côté droit.

Dans un cas extrême nous avons pu compter chez une jeune Grenouille 19 gonocytes en division; le nombre total des cellules femelles pouvant être évalué à un total voisin de 12.000, le nombre des mitoses, rapporté à ce total, n'est ici que de 0·16 pour cent environ. On peut considérer que chez la plupart des jeunes femelles, le rapport en question est certainement inférieur à ce nombre.

En résumé la fréquence des mitoses est un peu plus élevée dans les testicules que dans les ovaires, ce qui s'accorde avec l'allure respective des premiers stades de la gamétogénèse dans l'un et l'autre sexe: chez le mâle, après la constitution du premier stock de spermatocytes, se rencontrent quelques divisions goniales isolées, qui semblent annoncer les grosses poussées ultérieures de la spermatogénèse de l'adulte; chez la femelle, où les éléments germinaux sont à l'état d'ovocytes plus ou moins grands, les ovogonies de réserve ne sont plus qu'en très petit nombre, avec de très rares divisions. Mais on peut dire que dans les deux sexes, à ce moment de la vie individuelle, il n'y a de divisions multiplicatives qu'en nombre infime.

C'est à ces données qu'il faut comparer celles que fournissent les animaux fortement stérilisés.

Étude des gonades atrophiques résultant d'une stérilisation dans l'œuf. — Nous examinerons d'abord les cas où l'action des rayons U.V. a été peu intense par suite soit de circonstances de hasard, soit de l'intention de l'expérimentateur: les gonades n'ont subi qu'une faible réduction et se trouvent encore abondam-

ment pourvues de gonocytes. La recherche des divisions cellulaires y est difficile, et leur nombre relatif ne peut être établi d'une façon valable.

En effet la structure des glandes génitales, si elle est, dans ce cas, encore proche de celle des glandes normales, est beaucoup plus irrégulière, les gonocytes, présents en grand nombre, étant inégalement répartis sur la longueur de l'organe, dont le calibre varie beaucoup sur les coupes successives. Cette irrégularité de forme exclut la possibilité d'évaluer le nombre total des gonocytes subsistants; car cette opération qui consiste, pour une glande coupée en série, à faire une numération moyenne sur quelques coupes et à calculer le total approximatif pour la série complète, ne donnerait ici qu'un résultat probablement très aberrant par rapport à la réalité. Le nombre relatif des gonocytes en division ne peut donc être établi avec quelque certitude.

Les recherches que nous avons faites dans ce cas nous ont donné des nombres de mitoses toujours inférieurs à 20, le plus faible étant de 5. Les Fig. D et E (Planche 1) montrent chacune un gonocyte en métaphase, sur des coupes qui offrent de grandes différences de taille et d'aspect.

Si, pour les raisons indiquées, l'évaluation d'un pourcentage de divisions est ici impossible, l'observation, conduite sans la préoccupation d'un résultat numérique, révèle, en gros, qu'il n'y a pas de différence importante entre les animaux témoins et ceux où le germe est encore largement présent; autrement dit ces derniers ne permettent pas de discerner les signes d'une régulation quand la lignée germinale n'est pas plus gravement détruite.

C'est quand la stérilisation a été massive ou subtotal que les faits sont le plus intéressants: c'est le cas lorsque la lésion du déterminant germinal n'a épargné qu'un nombre de gonocytes inférieur à une centaine. Alors la présence de mitoses relativement fréquentes, souvent d'une belle lisibilité, attire immédiatement l'attention dans le tissu de glandes parfois très simplifiées et de structure très claire. C'est l'observation de ces mitoses qui nous a amenés à faire une étude systématique du phénomène, étude qu'aucune idée théorique *a priori* ne pouvait suggérer. Les Fig. F à O (Planches 1 et 2) en montrent des exemples typiques.

TABLEAU 3

Nombre total de gonocytes	Gonocytes en division	
	Nombre	Pourcentage
100 env.	10	10
30 env.	4	13.3
15 env.	6	40

Dans les gonades très fortement dépeuplées, il devient possible de compter les gonocytes un à un, avec une marge d'erreur relativement faible, et l'on peut alors chercher à établir la fréquence relative de ceux qui sont en division.

Sur 59 jeunes Grenouilles issues d'œufs irradiés, 22 se sont prêtées à une

numération qui peut être regardée comme correcte. Parmi ces animaux, nous donnons d'abord trois exemples individuels (Tableau 3), dont deux représentent des jalons extrêmes, l'un possédant pour ses deux ovaires un total approximatif de 100 gonocytes, l'autre un nombre réduit à 15 unités; entre les deux on peut placer un cas moyen, où le nombre des gonocytes était de 30 environ.

La comparaison de ces trois cas individuels fournit déjà une indication sur l'augmentation, *grosso modo*, de l'activité mitotique de la lignée germinale, quand sa destruction est poussée à des degrés qui approchent de la stérilisation totale. Cette indication se renforce avec plus de précision quand on envisage l'ensemble des 22 cas étudiés.

Nous avons partagé cet ensemble en trois séries, suivant le nombre de gonocytes subsistants dans les glandes génitales de l'animal; dans chaque série, nous avons établi, pour le nombre correspondant d'individus, le total des gonocytes présents et le total des gonocytes en division, cette méthode ayant l'avantage de réduire l'importance des erreurs portant sur les numérasions individuelles; le pourcentage des mitoses est calculé d'après ces nombres totaux (Tableau 4).

TABLEAU 4

	<i>Nombre de gonocytes par individu</i>	<i>Nombre d'individus</i>	<i>Nombre total de gonocytes</i>	<i>Nombre total de mitoses</i>	<i>Pourcentage</i>
1 ^{ère} série	entre 100 et 50	8	618	52	8·4
2 ^e série	entre 50 et 25	7	269	39	14·6
3 ^e série	entre 25 et 15	5	93	28	30·1

On a vu que chez les animaux normaux l'activité mitotique des gonocytes, à l'époque de la métamorphose, s'exprime chez les mâles, où elle semble plus élevée que chez les femelles, par un pourcentage très faible de 0·5 pour cent. Les données ci-dessus accusent un accroissement marqué de cette activité lorsque la lignée germinale n'est plus représentée chez la jeune Grenouille que par un nombre d'éléments inférieur à 100. Et l'on peut dire qu'en gros le nombre relatif des gonocytes en mitose s'élève d'autant plus que le procédé de stérilisation a produit une dévastation plus accentuée du germen.

Est-il possible de trouver, en dehors des figures de division, d'autres signes d'une multiplication accrue des gonocytes? Telle est, pour nous, la signification de certains groupes d'éléments germinaux *isogéniques*, qui s'observent également dans les gonades en partie stérilisées.

Il s'agit de groupements caractéristiques, comprenant soit 2, soit 4 gonocytes, entourés d'une enveloppe de petites cellules somatiques qui les isole, et se présentant strictement au même stade d'évolution nucléaire (Fig. P et Q, Planche 2). La ressemblance d'aspect des éléments ainsi groupés par 2 ou par 4, est toujours frappante: les noyaux y sont généralement au stade leptotène, ou parfois dans cet état compact et indéchiffrable, mais caractéristique, autrefois désigné sous le nom de *synapsis*, et aujourd'hui sous celui de *synizesis*. On ne peut que voir dans

de tels groupements des cellules-sœurs, nées de la division tardive d'un élément germinal, et qui sont le début de la formation d'un nid d'ovules ou d'une ampoule testiculaire. Leur présence corrobore la réalité d'une activité de multiplication, corrélatrice de la destruction sub-totale de la lignée germinale.

Discussion et conclusion. — L'observation de fréquentes divisions des gonocytes chez les jeunes Grenouilles issues d'œufs à déterminant germinal irradié, nous a amenés à reconnaître que le nombre de ces divisions augmente en moyenne avec le degré de destruction de la lignée germinale.

On ne peut faire à leur sujet que deux hypothèses: ou bien elles représentent un épisode de la phase de multiplication de la gamétogénèse, ou bien elles ont la signification d'un phénomène de régulation du germen. Or on ne peut retenir la première hypothèse, car la comparaison avec les gonades des animaux témoins du même âge montre que la phase de multiplication est complètement révolue, au moins dans le sexe femelle, quand l'animal se métamorphose; chez les témoins, en effet, la plupart des cellules germinales sont déjà à l'état de cytes et les divisions de gonies résiduelles y sont tout à fait rares et exceptionnelles. Nous pensons donc que dans les animaux d'expérience, les divisions des éléments reproducteurs sont un phénomène nouveau, inhabituel, suscité par la déficience même de la lignée germinale, et constituant le mécanisme régulateur qui tend à reconstituer cette lignée.

On sait que la biologie moderne a introduit dans la conception générale de l'organisme et de la vie l'idée d'une grande fonction de *régulation* qui permet au vivant, quand son débat avec le monde aboutit à des 'catastrophes', — et l'expérimentateur est un grand agent de catastrophes — de rétablir sa constitution et son ordre propres: dans l'existence de cette propriété, K. Goldstein, par exemple, voit avec raison 'une loi biologique fondamentale' (1951, pp. 96-98). On pouvait se demander si le pouvoir de régulation, grâce auquel l'individu si souvent rétablit son équilibre physiologique ou répare son soma mutilé, entre aussi en jeu pour restaurer le germen endommagé, et notamment après l'effet destructeur des rayons U.V. sur le déterminant germinal.

La question de la régénération de la lignée germinale n'est pas nouvelle; un grand nombre d'auteurs ont cherché la source d'une telle régénération dans des éléments somatiques, capables de se transformer en gonocytes secondaires, pour remplacer les *gonocytes primaires*, disparus par dégénérescence naturelle ou par l'effet d'une cause expérimentale. Mais des observations contraires, beaucoup plus probantes, permettent de nier toute formation, aux dépens du soma, d'une deuxième génération de gonocytes — question qui a été longuement discutée dans l'ouvrage antérieur de l'un de nous (Bounoure, 1939, pp. 156-9) — et une belle expérience d'Ancel et Bouin (1926) tranche la question d'une façon catégoriquement négative chez les Mammifères. En conséquence on peut admettre que le soma est incapable d'assurer une reconstitution du germen, et que dans le cas d'une destruction *totale* de la lignée germinale, celle-ci ne peut être régénérée.

Mais l'expérience d'irradiation du déterminant polaire chez la Grenouille

produit rarement une abolition totale du germen; elle laisse souvent au contraire subsister un petit nombre d'éléments de valeur germinale, réalisant ainsi la condition la plus favorable pour permettre de voir qu'il y a là effectivement le point de départ d'une régénération possible.

D'après les faits observés, cette régénération paraît ne s'établir qu'au moment de la métamorphose, comme si elle était liée à cette crise physiologique générale de l'organisme; il est clair que si elle avait commencé précoce dans la vie larvaire, elle aurait eu le temps de reconstituer une grosse population de gonocytes. Il nous est actuellement impossible de dire si ce début ou cette tentative de régénération se poursuit chez la Grenouille adulte avec des effets importants. En tout cas les signes de la multiplication des gonocytes résiduels à l'époque de la métamorphose revêtent la signification d'un véritable phénomène de régulation de la lignée germinale.

Il est donc permis de dire que la fonction de régulation joue au profit de l'espèce comme au profit de l'individu, et si on pouvait le supposer *a priori*, il n'en était que plus nécessaire d'en chercher la vérification dans une analyse précise des faits.

RÉSUMÉ

1. Par son caractère positif et sa valeur expérimentale, la notion de 'déterminant germinal' dépasse les vieilles discussions sur la prédestination et l'épigénèse. Toute formation ou tout ségrégat reconnu dans l'œuf ou l'embryon peut être dit 'localisé' ou 'prédestiné' dans la mesure où l'expérience le révèle comme tel; cette localisation n'exclut nullement son rôle dynamique dans les processus d'épigénèse, qui, d'un œuf en apparence homogène, font sortir la diversité d'un organisme. Si le déterminant du germe se présente, dans la plupart des cas, comme une 'localisation' ovulaire, c'est que l'œuf n'est pas un commencement absolu, et que l'ovogénèse fait partie, comme phase d'épigénèse organisatrice, de l'ontogénèse au sens large. C'est la présence de ce déterminant qui fait des divisions de segmentation un mécanisme ségrégatif, dissociant le matériel embryonnaire dans les lignées distinctes du germe et du soma.

2. L'action de rayons ultra-violets ascendants sur le pôle inférieur de l'œuf de Grenouille fournit rarement, et seulement de façon capricieuse, une stérilisation totale. Mais on améliore notablement le pourcentage des réussites,

- (a) en déprimant le pôle inférieur de l'œuf en une calotte plane, adjacente par sa surface au support de quartz perméable aux rayons;
- (b) en pratiquant l'irradiation au moment où l'œuf va effectuer sa première division, soit environ 3 heures après la fécondation.

L'analyse des faits tend à montrer: 1° que le déterminant germinal est d'abord dispersé dans une calotte assez étendue au pôle inférieur de l'œuf; 2° qu'au moment où va apparaître le premier cloisonnement, il s'est concentré au voisinage même du pôle dans une zone plus étroite, où il est plus efficacement soumis à l'action destructrice des rayons U.V.

3. Alors que dans les gonades des animaux normaux à l'âge de la métamorphose, les divisions des gonocytes sont en nombre infime (de l'ordre de 0·5 pour cent), chez les animaux d'expérience, où le nombre des gonocytes subsistants n'est plus qu'égal ou inférieur à une centaine, la fréquence relative des mitoses augmente visiblement; elle paraît s'accroître dans la mesure où la stérilisation est plus poussée: elle atteint jusqu'à 30 pour cent (moyenne de 5 animaux) quand le nombre des gonocytes tombe entre 25 et 15. Tout se passe donc comme si une activité mitotique inhabituelle répondait aux conditions créées par la stérilisation et tendait à une restauration du germen, exemple d'une faculté de régulation qui joue ici en faveur de l'espèce.

SUMMARY

1. By its positive character and heuristic value the notion of 'germinal determinant' goes beyond the categories of the old discussions on preformation and epigenesis. Every formation and every segregation found in egg or embryo may be called 'localized' or 'predetermined' in so far as experiment reveals it to be so; and this localization in no way excludes its dynamic role in the epigenetic processes by which, from an egg homogeneous in appearance, emerges the diversity of the organism. If the determinant of the germ-line is manifested, in most cases, as a 'localization' in the egg, this is because the egg is not an absolute beginning, and ovogenesis, as a phase of epigenetic organization, is part of ontogenesis broadly conceived. It is the presence of this determinant which makes a segregating mechanism out of the segmentation divisions, separating the embryonic material into the distinct lines of germ and soma.

2. The action of ultra-violet irradiation directed upwards on to the lower pole of a frog's eggs results in a total sterilization only rarely and capriciously. But the percentage of successes is greatly improved,

- (a) by compressing the lower pole of the egg so that it forms a flat cap, its surface against the quartz support which is ultra-violet permeable;
- (b) by irradiating just before the first division of the egg, about 3 hours after fertilization.

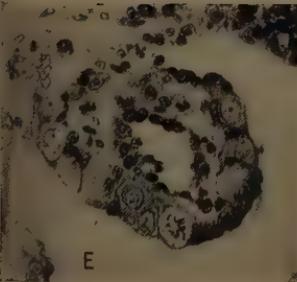
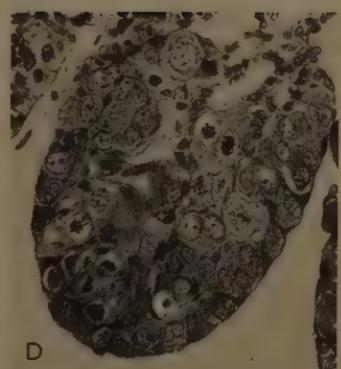
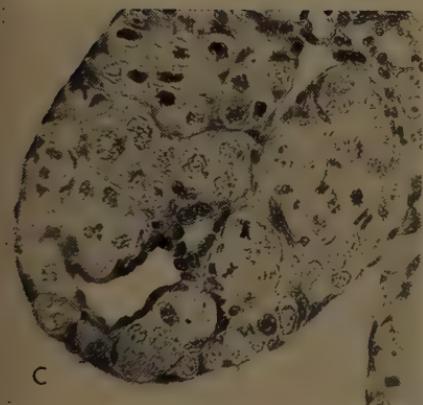
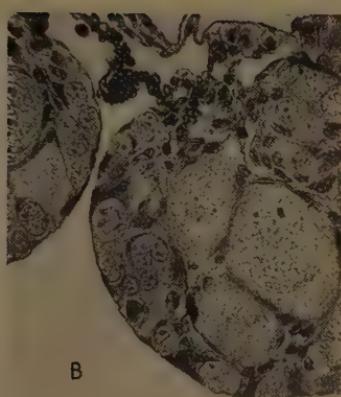
Analysis of the facts seems to show: (1) that the germinal determinant is first of all spread as a rather extensive cap at the lower pole of the egg; (2) that at the moment when the first division is about to appear it is concentrated in the neighbourhood of the pole itself in a restricted zone, where it is more effectively exposed to the destructive action of the U.V. radiation.

3. While in the gonads of normal animals at metamorphosis, divisions of gonocytes are present in very small numbers (of the order of 0·5 per cent.), in experimental animals where the number of persisting gonocytes is only 100 or fewer the relative frequency of mitoses is visibly increased. It seems to increase as the degree of sterilization is more extreme: it reaches 30 per cent. (mean of 5 animals) when the number of gonocytes falls to between 25 and 15. It is as if an unusual

mitotic activity was a response to the conditions created by the sterilization and was tending to restore the germ-line: an example of a power of regulation which is here acting in favour of the species.

TRAVAUX CITÉS

- ANCEL, P., & BOUIN, P. (1926). Recherches expérimentales sur l'origine des gonocytes dans le testicule des Mammifères. *C.R. Ass. Anat.*, **21^e** Réunion, 1.
- AUBRY, R. (1953). Nouveaux essais de stérilisation totale des gonades de *Rana temporaria* par action des rayons ultraviolets sur le pôle inférieur de l'œuf fécondé. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **236**, 1101.
- (1953). Analyse de certaines conditions expérimentales favorisant la stérilisation *ab ovo* de la Grenouille rousse. *C.R. Soc. Biol., Paris*, **147**, 893.
- BOOUNOURE, L. (1931). Sur l'existence d'un déterminant germinal dans l'œuf indivis de la Grenouille rousse. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **193**, 402.
- (1935). Une preuve expérimentale du rôle du déterminant germinal chez la Grenouille rousse. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **201**, 1223.
- (1935). Sur la possibilité de réaliser une castration dans l'œuf chez la Grenouille rousse, résultats anatomiques. *C.R. Soc. Biol., Paris*, **120**, 1316.
- (1937). Les suites de l'irradiation du déterminant germinal, chez la Grenouille rousse, par les rayons ultra-violets: résultats histologiques. *C.R. Soc. Biol., Paris*, **125**, 898.
- (1937). Le sort de la lignée germinale chez la Grenouille rousse après l'action des rayons ultra-violets sur le pôle inférieur de l'œuf. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **204**, 1837.
- (1939). *L'Origine des cellules reproductrices et le problème de la lignée germinale*. Paris: Gauthier-Villars.
- (1950). Sur le développement sexuel des glandes génitales de la Grenouille en l'absence de gonocytes. *Arch. Anat. micr.* **39**, 247.
- GEIGY, R. (1931). Action de l'ultra-violet sur le pôle germinal dans l'œuf de *Drosophila melanogaster*, castration et mutabilité. *Rev. suisse Zool.* **38**, 187.
- GOLDSTEIN, K. (1951). *La Structure de l'organisme. Introduction à la biologie*. Trad. de l'allemand par E. Burckhardt et J. Kuntz. Paris.
- HEGNER, R. H. (1914). Studies on germ-cells. I. The history of the germ-cells in Insects with special reference to the Keimbahn-determinants. II. The origin and significance of the Keimbahn-determinants in animals. *J. Morph.* **25**, 375.
- HUCK, M. L., & AUBRY, R. (1952). Sur les signes d'une régulation du germe dans les gonades de *Rana temporaria* après destruction étendue du déterminant germinal. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **234**, 1922.
- MULNARD, J. (1947). Quelques données sur la répartition de l'acide ribonucléique dans le développement embryonnaire des Insectes. *C.R. Ass. Anat.* **34^e** Réunion, 393.
- NIEUWKOOP, P. D. (1946). Experimental investigations on the origin and determination of the germ cells, and on the development of the lateral plates and germ ridges in Urodeles. *Arch. néerl. Zool.* **8**, 1-205.
- (1950). Causal analysis of the early development of the primordial germ cells and the germ ridges in Urodeles. *Arch. Anat. micr.* **39**, 257-68.
- PASTEELS, J. (1948). Recherches sur le cycle germinal chez l'*Ascaris*. Étude cytochimique des acides nucléiques dans l'oogénèse, la spermatogénèse et le développement chez *Parascaris equorum* Goerze. *Archives de Biologie, Liège et Paris*, **59**, 405.



L. BOUNOURE, R. AUBRY, & M.-L. HUCK

Plate I



L. BOUNOURE, R. AUBRY, & M.-L. HUCK

Plate 2

EXPLICATION DES PLANCHES

Grossissements: Fig. A à G, 310×. Fig. H à Q, 390×.

Nota: Quelques figures de mitose, peu distinctes sur la photographie, ont été légèrement retouchées.

PLANCHE 1

FIG. A. Testicule normal avec un gonocyte en anaphase sur le bord gauche de la coupe.

FIG. B et C. Ovaires normaux: une mitose sur le bord gauche de la fig. B; 2 mitoses voisines sur le bord droit de la cavité ovarienne, fig. C.

FIG. D et E. Deux ovaires ayant conservé des gonocytes nombreux et très inégalement répartis; une métaphase près du bord droit (fig. D), et près de l'extrémité de l'organe (fig. E).

FIG. F et G. Deux gonades à nombre de gonocytes entre 100 et 50; une mitose (métaphase) sur chacune des figures.

PLANCHE 2

FIG. H à L. Quatre gonades à nombre de gonocytes entre 100 et 50; une mitose (métaphase) sur chacune des fig. H à K; deux mitoses côte à côte sur la fig. L.

FIG. M. Coupe d'un testicule possédant 42 gonocytes, l'un d'eux vu en métaphase.

FIG. N. Coupe d'un testicule possédant 23 gonocytes, l'un d'eux vu en anaphase.

FIG. O. Coupe d'un ovaire n'ayant plus que 15 gonocytes, l'un d'eux vu en métaphase.

FIG. P. Coupe d'un testicule montrant 3 groupes de 2 ou 4 cellules germinales isogéniques (en synapsis).

FIG. Q. Coupe d'un ovaire, montrant un nid de 4 gonocytes au stade leptotène.

(Manuscript received 25:ii:54)

Collagen Formation and Wound Contraction during Repair of Small Excised Wounds in the Skin of Rats

by M. ABERCROMBIE, M. H. FLINT, and D. W. JAMES¹

From the Department of Anatomy, University College London

INTRODUCTION

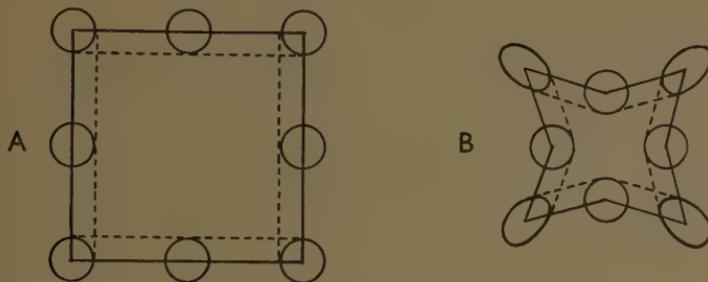
DURING the healing of an open wound in the loose skin of a mammal there occurs a conspicuous diminution of wound size, the result of a centripetal movement of the whole thickness of the surrounding skin, with a corresponding shrinkage of the wound content. This 'wound contraction' is distinct from the process of epithelialization. Many authors (e.g. v. Gaza, 1918; Lindquist, 1946) have supposed that wound contraction is in some way causally related to the process of collagen formation, which is simultaneously occurring in the wounded area. The investigation of this supposed relation requires a more exact quantitative picture of collagen formation in skin wounds than is at present available from histological studies (such as those of Dann, Glücksmann, & Tansley, 1941; Hunt, 1941; Lindquist, 1946) or from investigations of changes in tensile strength (such as those of Howes, Sooy, & Harvey, 1929; Botsford, 1941). We have therefore applied a chemical method of collagen estimation, that of Neuman & Logan (1950), to the early stages of healing in a standardized skin wound, at the same time following the process of contraction by means of tattoo-marks in the adjacent normal skin.

METHOD

The aim of the technique was to make a standard tattoo-mark, consisting of a number of separate points, and to cut out the area of skin immediately within it (Text-fig. 1A). The tattoo then indicated the border of normal skin throughout the process of contraction and enabled us to remove the region of newly formed tissue at any time for collagen estimation. We shall refer to this region throughout the process of healing, regardless of the extent of its epithelialization, as the 'wounded area'. Measurements of the size of the wounded area were made; but size changes during contraction could be more accurately obtained by measuring the rather larger area (the 'tattoo-area') demarcated by the centres of the tattoo-points instead of by their inner margins (Text-fig. 1). Two forms of tattoo-mark

¹ Authors' address: Department of Anatomy, University College London, Gower Street, W.C.1, U.K.

were used. In one, 4 tattoo-points marked out the corners of a square with 5-mm. sides; in the other, 8 tattoo-points marked out a square of the same size, 4 at the



TEXT-FIG. 1. Diagram of position of tattoo-marks and measurements of 8-point tattoos. A, at operation: the 8 tattoo-points are shown as open circles; the measured tattoo-area is marked out by a continuous line joining the centres of the tattoo-points; the area excised (wound area) is the square marked out by the dotted lines. B, after contraction (10, 15, or 25 days after initial operation). The corner points are now elliptical; the mid-side points, usually less distorted than the corner points, are represented as circles. The tattoo-area and wounded area are now of stellate shape.

corners and 4 midway along the sides. Because of the change in shape of the tattoo-area during its contraction, described below, 8-point tattoos gave a more accurate picture of the course of contraction than 4-point tattoos. Ideally they would have been used also for determination of collagen within the wounded area, but after contraction it proved impossible to cut out the wounded area inside the 8-point tattoo more accurately than inside the 4-point, because the 8 points had moved so closely together. The cruder 4-point marks were therefore used for collagen estimation.

Animals. Several batches of male white rats were used. The members of any one batch were tattooed at the same time and operated on at the same time, but usually underwent several different treatments. There were 6 treatment groups. Groups A, B, C, and D with 4-point tattoos were used for collagen estimation at 5, 10, 15, and 25 days respectively after the initial wounding; each of these treatment groups was made up of members of 4 different batches of rats. Two treatment groups (groups E and F with 8-point tattoos), used mainly for measurement of contraction, each consisted of a single batch operated on simultaneously and killed after 10 and 25 days respectively.

Tattooing. Hair was removed with electric clippers to avoid damage to the skin. Two tattooed squares were made on each rat in the dorsolumbar region, one on each side of the middle line. Tattooing was done, under ether anaesthesia, by a machine with 4 or 8 appropriately spaced needles. The needles were driven rapidly up and down by an electric motor; they moved through small holes in the base of a trough containing commercial Indian ink, the underside of the trough

lying against the animals' skin. The individual points of the tattoos varied in size. Rats bearing very large or very small points were discarded. The Indian ink was usually driven into the skin as a perpendicular column right down to the deep fascia.

Operation. A few days after tattooing, those animals marked with suitable intensity and showing no sign of inflammation were selected for operation on one of the two tattoo-marks, the other remaining as an unoperated control. Under ether anaesthesia, after swabbing with 1 per cent. cetyl trimethyl ammonium bromide, a square of skin was marked out within the tattooed square by superficial cuts which just touched the inside of each adjacent pair of tattoo-points. The cuts were then deepened, as perpendicularly to the skin surface as possible, through the panniculus carnosus to the deep fascia. The piece of skin thus isolated was removed, weighed, and its collagen estimated. No dressing was applied. Signs of infection were very rare (for the validity of such signs see Lindquist, 1946) and any suspicion of infection led to rejection of the animal.

At biopsy in those groups used for collagen estimation the wounded area as defined above was removed by exactly the same technique, cutting just inside the tattoo-points which marked the border of the original skin. The square of skin within the unoperated control tattoo-mark was similarly removed for estimation.

Measurements. In groups A-D the tattoo-area was calculated from linear measurements made on the operated side before and after operation and before and after biopsy, and on the control side at the time of the initial operation and before and after biopsy. The mean length of each pair of opposite sides was obtained, and the product of the two means was recorded as the area. At operation and autopsy the size of the wounded area was also measured after it had been marked out by the superficial cuts. Tattoo-areas of group F were measured not only at operation and at biopsy but also during healing at 5, 10, and 15 days after operation so as to provide a sequence of measurements on the same wounds. These 8-point tattoos were measured by tracing the tattoo-points on to transparent paper and subsequently measuring the areas from the tracings with an accurate disk planimeter.

Chemical estimation of collagen was by the hydroxyproline method of Neuman & Logan (1950). Estimates were made in duplicate, and repeated if serious disparities occurred within the pair. Each set of estimates was independently checked against standard solutions of hydroxyproline. Scabs were not included in the material estimated. Some of the 5-day wounded areas were extracted first in 20 per cent. urea to test whether soluble hydroxyproline might be present, but the hydroxyproline content of these specimens did not differ from that of unextracted ones. The results have been expressed in mg. of collagen by multiplying the hydroxyproline values by 7.46.

Statistical control. The mean body-weight of the 65 rats used was 273 g., range 159 to 463, standard deviation 64. Analysis of variance showed that, of the six experimental groups, one (group A, used for collagen determination at 5 days)

was significantly heavier than the rest in mean body-weight ($P = 0.02$). There was no significant difference amongst the other five groups ($P > 0.2$). Since there appeared by inspection to be no correlation between body-weight and any of our results, this failure of randomization has been disregarded.

The tattoo-areas (mean 24.5 mm.², standard deviation 3.0) did not differ significantly in mean size amongst the six groups when compared by analysis of variance ($0.1 > P > 0.05$); nor did wounded areas differ (mean 16.7 mm.², standard deviation 3.3; for difference between groups $P > 0.2$); nor collagen removed at initial operation (mean 3.92 mg., standard deviation 0.81; for difference between groups $P > 0.2$); nor wet weight of piece removed at initial operation (mean 25.7 mg., standard deviation 6.3; for difference between groups $P > 0.2$).

RESULTS

Contraction

Contraction as measured by the tattoo-marks is quite distinct from epithelialization. Our measurements have not been concerned with the progress of epithelialization, which in these wounds is complete by about 10 days after wounding. The most reliable picture of the course of contraction in our standard wounds comes from the 11 rats of group F in which the changes in 8-point tattoo-areas were followed, as already described, by tracing the tattoo-marks at intervals and subsequent planimetry. Starting from a tattoo-area with a mean and standard error of 25.1 ± 0.5 mm.² immediately after operation, the mean area in mm.² at 5 days had become 21.1 ± 1.4 , at 10 days 11.5 ± 0.5 , at 15 days 11.1 ± 0.6 , and at 25 days 11.2 ± 0.5 . The total amounts of contraction from the initial area which had occurred after the successive time-intervals are therefore as follows (in mm.², means with standard errors): after 5 days 4.1 ± 1.6 ; after 10 days 13.6 ± 0.8 ; after 15 days 14.0 ± 0.7 ; and after 25 days 13.9 ± 0.6 . The contraction during the first 5 days is significantly different from zero ($P = 0.02$); the further contraction during the second 5 days is obviously highly significant. The amount of contraction is significantly greater between 5 and 10 days than between 0 and 5 days ($0.02 > P > 0.01$). After 10 days contraction has evidently ceased. Dann, Glücksmann, & Tansley (1941) studying similar-sized wounds also found little contraction beyond 10 days and Lindquist (1946), using larger wounds, little beyond 12 days.

The contraction of these rectangular wounds is consistently accompanied by a change in shape of the tattoo-area of the kind figured by Billingham & Reynolds (1952). The points at the middle of the sides of the original square are drawn inwards more than those marking the corners, so that the tattoo-area tends towards the shape of a 4-pointed star (Text-fig. 1B). The differential movement of the points can be shown by measuring the distance apart of points that lie opposite each other in the tattoo design, at the time of operation and when contraction has ceased (at 10 days and after). Opposite corner points moved towards

each other 1.49 ± 0.16 mm. (36 measurements), while opposite mid-side points moved 1.85 ± 0.12 mm. (36 measurements). The mean of the differences between the total amount of inward movement of corner points and the total amount of inward movement of mid-side points occurring in each wound is significant ($0.02 > P > 0.01$). These measurements were made from the middle of each tattoo-point; a necessary qualification because during contraction the tattoo-points often become elongated radially to the wound, particularly those at the original corners which tend to be drawn out in the direction of the original diagonals (see Text-fig. 1). A change in shape of the tattoo-area from a square to a concave figure might itself account for a good deal of the diminution of area, but it does not account for all of it; for the length of the perimeter of the tattoo-area also diminishes. Between 0 and 10 days its mean length in mm. decreases from 20.2 ± 0.3 to 15.3 ± 0.4 (10 measurements of each). The mean of the differences, 4.9 ± 0.3 , is clearly significantly different from zero. No significant changes in linear measurements occur between 10 and 25 days; not only area but also shape therefore remains practically stable during this period. Throughout the whole period of 25 days studied in this group of rats no change could be detected in the unoperated control tattoo-areas, the size of which in mm.^2 was as follows: initially 25.3 ± 1.0 ; at 5 days 25.3 ± 1.0 ; at 10 days 25.2 ± 1.2 ; at 15 days 25.3 ± 1.0 ; and at 25 days 24.5 ± 0.9 . No allowance is therefore required for growth of the animals.

The four groups (A-D) with 4-point tattoos, which were killed at different intervals after operation, confirm this description of contraction. The mean amount of contraction of area in mm.^2 for each group is given in Table 1. The

TABLE 1

Wound contraction in experiments with 4-point tattoos. 'Mean deficit' of wet weight is mean of the results of subtracting the wet weight of the wound content from that of the original piece of skin removed at operation

Rat group	A	B	C	D
Time since operation, days	5	10	15	25
No. of rats	10	10	10	11
Tattoo-area, mean diminution, mm.^2	5.3 ± 1.0	10.2 ± 0.8	9.5 ± 1.1	11.0 ± 1.4
Wounded area, mean diminution, mm.^2	4.9 ± 0.7	8.5 ± 1.3	9.4 ± 0.9	9.0 ± 1.8
Wet weight, mean deficit, mg.	8.4 ± 1.4	12.3 ± 3.0	17.7 ± 2.2	15.2 ± 4.0

stability of size between 10 and 25 days is again demonstrated. The smaller amount of contraction which seems to have occurred, as compared with that found in the 8-point experiments, is merely the result of the simplified technique of marking and measuring used in obtaining the 4-point data. There are two equally important sources of the discrepancy: (a) in the 4-point tattoos, but not

in the 8-point, the change of shape caused by indentation of the sides of the square has been disregarded; (b) in the 4-point tattoos, but not in the 8-point, the tattoo-area has been treated as a rectangle and its area calculated from linear measurements, though it commonly became slightly distorted towards a non-rectangular parallelogram. When 8-point tattoos of between 10 and 25 days of healing were measured as if they were 4-point tattoos, they showed the same degree of contraction ($9.4 \pm 0.7 \text{ mm}^2$, $N = 19$) as 4-point tattoos. Our data show in fact that contraction after a standard wound is quantitatively highly reproducible.

The area of the actual wound, which lies inside the tattoo-points, has the same pattern of contraction (Table 1). The wet weight of the material filling the wound also follows the same pattern of decrease (Table 1).

The slightly greater contraction of tattoo-areas as compared with wounded areas shown in Table 1 suggests that not only does the wound diminish in area but so also does the surrounding rim of the original skin. That this is so can be shown by measuring the marginal band of old skin lying between the lines circumscribing the outside and the inside margins of the tattoo-points. In group E, which had 8-point tattoos, during the 10 days after wounding this rim contracted on the average from 16.7 to 13.8 mm^2 , the mean of the differences, 2.9 ± 0.7 ($N = 12$) being highly significantly different from zero ($P < 0.01$). The process of contraction therefore involves some compression of the original skin immediately around the wound.

The result of contraction is to put the surrounding skin under tension. This is shown by the increase in size of the tattoo-area and of the wounded area when the newly formed tissue which fills the wounded area is excised. A group of 17 wounds at 10, 15, or 25 days after initial operation showed, a few minutes after such excision, a mean re-expansion of $5.2 \pm 0.6 \text{ mm}^2$ in tattoo-area and $5.2 \pm 0.7 \text{ mm}^2$ in wounded area. Corresponding figures for excisions on normal skin are $1.4 \pm 0.4 \text{ mm}^2$ in tattoo-area (59 specimens) and $1.6 \pm 0.5 \text{ mm}^2$ in wounded area (32 specimens).

Collagen formation

The estimations of collagen content were made on groups A-D which had been marked with 4-point tattoos and were killed at 5, 10, 15, and 25 days after initial operation respectively. Table 2 and Text-fig. 2 show the steady rise with time in collagen content of the wounded area. Certain reservations about the figures as estimates of absolute amounts of collagen formed during repair must, however, be made. The 5-day wounded area obviously has more than the zero content of collagen present immediately after initial operation; but this may be partly due to the inclusion of some old collagen from the wound-bed; as a result of the injury the deep fascia does not form such a clean plane as at the initial operation. The content at later stages is still more likely to be overestimated, because the wounded area has been treated as a rectangle when in fact it has

become stellate. A certain amount of the original marginal skin has probably therefore been included. The absolute collagen content of all the wounded areas is thus if anything likely to be a little overestimated. The 10-, 15-, and 25-day estimates are probably, however, fully comparable with each other since no change of shape of the wounded area occurs during this period. Strictly speaking these 10-, 15-, and 25-day figures do not allow us to go farther than to say with

TABLE 2

Collagen content of wounded areas at successive times during their repair. The collagen content of unoperated skin is that of the area removed to produce a standard wound. 'Wounded area' means the area undergoing repair at the time of biopsy; 'superficial area' and 'wet weight' refer to this wounded area

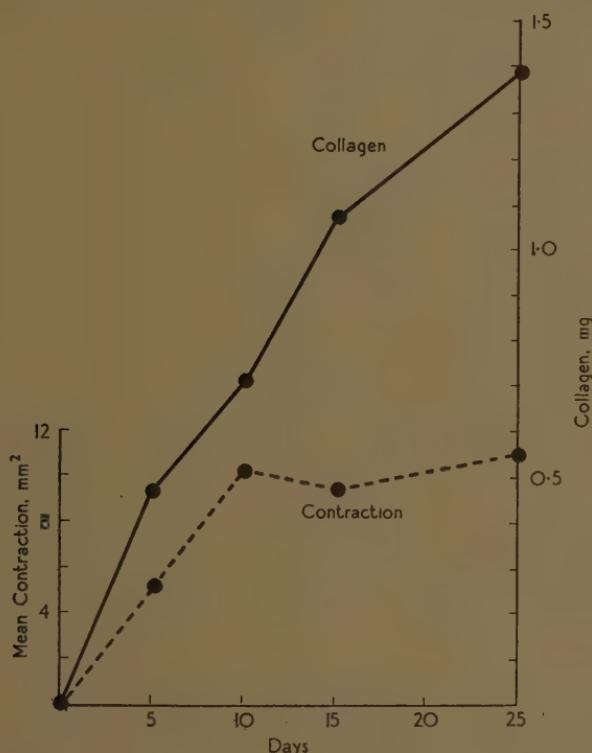
Rat group . . .	A	B	C	D	Unoperated skin
Time since operation, days.	5	10	15	25	0
No. of rats . . .	10	9	10	10	78
Collagen content of wounded area, mg. . .	0.47±0.12	0.71±0.10	1.07±0.17	1.39±0.24	3.75±0.12
Collagen/superficial area, $\mu\text{g./mm.}^2$. . .	40±11	84±18	136±14	137±12	232±8
Collagen/wet weight, $\mu\text{g./mg.}$	24±4	59±8	96±5	115±7	139±3

confidence that collagen continues to be formed after 10 days, that is to say after contraction has ceased. There is significantly more collagen at 25 days than at 10 days ($P = 0.02$), but not more than at 15 days. Since the initial wound was a little bigger in the 25-day group than in the 10-day, it has been necessary to confirm this by analysis of covariance, which shows that when the variance due to initial wound area is eliminated, the two groups remain significantly different ($t = 2.38$, 17 degrees of freedom, $0.05 > P > 0.02$). The general trend of the figures certainly encourages the hypothesis that collagen formation continues well beyond 10 days.

The amount of collagen in the wounded area represents the following percentage of the collagen removed at initial operation: at 5 days 10 per cent., at 10 days 19 per cent., at 15 days 29 per cent., and at 25 days 40 per cent. Obviously the collagen removed is not fully replaced during the period studied. But area and wet weight of the wounded area are simultaneously diminishing, so that the rise in collagen per unit area or per unit weight during healing is greater than the absolute rise of collagen content (see Table 2). Does the contraction bring collagen content relative to area or weight back to normal? In Table 2 the last column shows the values obtained from a large sample of normal skins, which obviously differ from the values at 25 days. The appropriate test of the significance of the difference is by analysis of covariance. Comparing the 25-day wounded areas with the normal skin of the same animals, the difference is highly significant when variance due to area of material estimated is eliminated ($0.01 >$

$P > 0.001$) or when variance due to wet weight of material estimated is eliminated ($P = 0.01$).

The criticism must be considered that the area of the skin to be assayed for collagen after contraction is overestimated by our method of measurement, in which the wounded area is obtained from linear measurements as if the tattoo-



TEXT-FIG. 2. Graph showing change of collagen content (continuous line) compared with diminution of wounded area (broken line) with time after initial operation.

marks formed a rectangle. Comparative estimates made on the same material by this method and by planimetry showed an overestimate of only 1.0 ± 0.3 mm.², i.e. about 13 per cent. of the total area, which is quite inadequate to account for the inferior collagen content per unit area of the wounded side. Furthermore, this bias is counterbalanced by a probable overestimate of collagen in the wounded area due to the inclusion of some normal skin in the wound; we are confident therefore that the bias in area estimation is of no importance.

As an additional check on the amount of collagen per unit area during repair, estimates have been made on the small area in the centre of the wound marked

out by the four mid-side tattoo-points of an 8-point tattoo; this area cannot have included any significant part of the original rim. The areas were measured by planimetry. These estimates are probably nearly at the limit of accuracy of our technique, but they gave reasonably concordant results. At 10 days (group E) μg . collagen per mm^2 area was 118 ± 27 and at 15 days (a special group of rats which had initial wounds 12 per cent. smaller than the standard) 120 ± 20 . The normal skin of these groups shows respectively 254 ± 11 and 249 ± 10 .

It may be concluded that at 25 days after wounding the wounded area is still very deficient in collagen.

DISCUSSION

Both histological examination (Hunt, 1941; Dann, Glücksmann, & Tansley, 1941) and measurements of tensile strength (Howes, Sooy, & Harvey, 1929; Botsford, 1941) suggest a progressive increase in concentration of collagen during healing of a wound, continuing at least until 10–15 days after wounding. Such investigations do not, however, enable us to argue with any confidence about the absolute amounts of collagen formed, since the volume of the tissue undergoing repair is changing, and in the absence of a quantitative expression of amount of collagen this cannot be allowed for. Chemical investigation, however, demonstrates quantitatively that both concentration and absolute amount of collagen in a wound increase during a period of more than 10 days after wounding.

Our results (Text-fig. 2) show that both contraction and collagen formation proceed together up to some point between 5 and 10 days after wounding. Beyond 10 days there is no further contraction but collagen formation continues. Clearly this dissociation of the two processes does not by itself invalidate the hypothesis that contraction is produced by new-formed collagen. There is recent evidence for an association of some kind between collagen formation and contraction in that both are simultaneously much diminished by cortisone treatment (Billingham, Krohn, & Medawar, 1951, *a* and *b*). Nevertheless, the dissociation we have found between the processes in the later stages of healing will need explanation before the hypothesis can be considered entirely satisfactory.

We have recorded four changes, apart from collagen formation, which accompany wound contraction.

1. There is a conspicuous loss of wet weight in the contracting area. Curiously enough this change does not seem to have been measured before. It confirms what casual inspection shows, that contraction involves no compensatory thickening of the wounded area. The loss of wound content, in our specimens amounting to about a half and in larger wounds probably to much more (judging by the relatively greater reduction in area; e.g. Lindquist, 1946; Billingham & Reynolds, 1952), is a serious problem for any theory of contraction.

2. Contraction develops a tension in the surrounding skin as shown by expan-

sion of the wound when the wounded area is cut out. This bears out the common view, recently supported by Lindquist (1946) who seems to have been the first to make the necessary experiments, that contraction is produced by an active diminution of the material within the area of the wound and not by a compressive movement of the surrounding normal skin. Lindquist observed a contraction of the wound contents when it was cut free from the surrounding skin.

3. There always develops an inward kinking of the sides of the originally square wounded area which is thereby converted to the shape of a 4-pointed star. This shape change is inconsistent with a sphincter-like action of the perimeter of the wound, as proposed by Hegemann (1950), and more tentatively by Dann, Glücksmann, & Tansley (1941), at least as a major mechanism of contraction. Sphincter action would on the contrary minimize perimeter length and thereby produce a rounding-off of the wounds. At first sight the stellate form might seem to be most easily accounted for by assuming an equal force applied to all parts of the perimeter, with a freely malleable wound margin: a star shape must then result since both corner points and mid-side points would move inwards the same absolute distance. Since, however, the mid-side points move inwards significantly *more* than the corner points, this hypothesis is inadequate. It is much more probable that the change of shape depends on the relative rigidity of the rim of the wound, which makes the mid-side points more easily pulled inwards than the corner points. An analogous change of shape occurs during the contraction of a drying cube of gelatin (Thompson, 1942, p. 562).

4. The rim of old tissue round the wound becomes shorter in circumference and smaller in area, the tattoo-marks, especially those at the corners, becoming distorted. These are the changes which the contraction of the area under repair might be expected to produce in a wound rim which has some degree of rigidity. The rim tends to be compressed, particularly at the corners.

SUMMARY

1. Standard wounds of approximately 17 mm.² area have been made in the dorsolumbar region of rats by cutting out a small square of skin within a standard tattoo-mark. By this technique, at 5, 10, 15, and 25 days after operation, the amount of wound contraction (disregarding epithelialization) has been measured, and the area of repair has been removed for collagen estimation by the hydroxyproline method of Neuman & Logan (1950).

2. Contraction had occurred significantly 5 days after operation, was very active between 5 and 10 days, and did not proceed farther after 10 days.

3. There was a decrease in wet weight of the wound content parallel to its contraction in area.

4. During contraction the wound changed in shape from a square to a 4-pointed star. The rim of old tissue surrounding the wound diminished in length and in area. When contraction had ceased the surrounding skin was under abnormal tension, judged by the expansion when the wounded area was excised.

These observations can be accounted for by supposing that the content of the wounded area exerts a contractile force, and that the rim of original skin has some rigidity.

5. Chemically measurable collagen formation had started 5 days after operation and it continued beyond 10 days, i.e. after contraction had ceased. The result was a progressive rise in both concentration and absolute amount of collagen in the wound. By 25 days the area under repair was, however, not nearly back to normal in collagen per unit area or per unit wet weight.

ACKNOWLEDGEMENTS

We should like to express our gratitude to the Nuffield Foundation for their financial assistance; to Professor J. Z. Young for his criticism of the manuscript; and to Miss Sylvia Jenkins for technical assistance.

REFERENCES

- BILLINGHAM, R. E., KROHN, P. L., & MEDAWAR, P. B. (1951a). Effect of cortisone on survival of skin homografts in rabbits. *Brit. med. J.* **1**, 1157-63.
 ——— (1951b). Effect of locally applied cortisone acetate on survival of skin homografts in rabbits. *Brit. med. J.* **2**, 1049-53.
 ——— & REYNOLDS, JOYCE (1952). Transplantation studies on sheets of pure epidermal epithelium and on epidermal cell suspensions. *Brit. J. plast. Surg.* **5**, 25-36.
 BOTSFORD, T. W. (1941). The tensile strength of sutured skin wounds during healing. *Surg. Gynec. Obstet.* **72**, 690-7.
 DANN, L., GLÜCKSMANN, A., & TANSLEY, K. (1941). The healing of untreated experimental wounds. *Brit. J. exp. Path.* **22**, 1-9.
 GAZA, W. v. (1918). Die Zuständsänderungen der Gewebskolloide bei der Wundheilung. *Kolloidschr.* **23**, 1-11.
 HEGEMANN, G. (1950). Experimentelle Studie über die Bedeutung und die Ursachen der Wundkontraktion bei der Wundheilung. *Beitr. klin. Chir.* **180**, 229-42.
 HOWES, E. L., SOOY, J. W., & HARVEY, S. C. (1929). The healing of wounds as determined by their tensile strength. *J. Amer. med. Ass.* **92**, 42-45.
 HUNT, A. H. (1941). The role of vitamin C in wound healing. *Brit. J. Surg.* **28**, 436-61.
 LINDQUIST, G. (1946). The healing of skin defects. An experimental study on the white rat. *Acta chir. scand.* **94**, Suppl. 107.
 NEUMAN, R. E., & LOGAN, M. A. (1950). The determination of collagen and elastin in tissues. *J. biol. Chem.* **186**, 549-56.
 THOMPSON, D. A. W. (1942). *On Growth and Form*. Cambridge: The University Press.

(Manuscript received 1 : iv : 54)

INSTRUCTIONS FOR CONTRIBUTORS

Contributions and correspondence about them should be sent to Mr. M. Abercrombie, Department of Anatomy and Embryology, University College, Gower Street, London, W.C.1, England.

Contributions should be as concise as possible. They should be typewritten, double-spaced, on one side of the paper, the pages numbered. They should be fully ready for press, since revision in proof will not be possible. Footnotes should be avoided. The author is advised to keep a copy of the typescript.

Tables should be on separate sheets, and numbered. Authors should indicate the places for their insertion in the margin of the typescript. *The Summary* should be in numbered paragraphs, and will be put at the end of the text. It should not exceed 500 words.

Acknowledgements should be placed immediately before the list of references.

References should be listed alphabetically. In the text they should be referred to by the author's name and the year of publication. If more than one reference to the same author and year is quoted, use suffixes *a*, *b*, & c. (e.g. 1951*a*) in text and reference list. Papers should be listed as follows: Surname followed by initials of author(s); year of publication; title of paper; name of journal (World List of Scientific Periodicals abbreviation), underlined; volume number; first and last page: e.g. Spemann, H., & Mangold, H. (1924). Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Arch. mikr. Anat.* **100**, 599–683. Books should be listed as follows: Surname followed by initials of author(s); year of publication; title underlined; place of publication; publisher: e.g. Dalcq, A. (1941). *L'Œuf et son dynamisme organisateur*. Paris: Albin Michel.

Illustrations. Line drawings should be used wherever possible, in preference to illustrations requiring half-tone reproduction. In general, their size should be such that they are reduced for publication to approximately two-thirds linearly. When reduced, no illustration together with its lettering should exceed five inches in width, and, if it is to occupy a whole page, seven and a half inches in length. Name of author and figure number should be written on

the back, together with the proposed reduction in size. Magnification should be indicated by a scale-line drawn in Indian ink on or beside all drawings and photographs.

Black and white line or line and dot drawings should have all lettering or numerals put in lightly in block capitals with a soft pencil. Charts and graphs may be drawn in Indian ink on graph paper ruled in pale blue. Where several drawings are grouped as one figure, distinguish them by capital letters (in pencil). Legends for all line drawings should be typed together on a separate sheet. The places for insertion in the text should be indicated in the margin of the typescript. The drawings should be referred to in the text as 'Text-fig. 1', &c.

Half-tone illustrations (photographs or drawings other than black and white) will be limited in number; authors may be asked to provide a grant for an excessive number. If fine detail is not required they can be reproduced amongst the text (please indicate position), in which case they should be numbered in series with the line drawings, if any. If fine detail is required, they will be on a separate plate. The legends should then be typed on a separate sheet, headed 'Explanation of Plate(s)', and the illustrations should be referred to in the text as 'Plate 1, fig. A', &c. Leader lines should be drawn in Indian ink. All letters or numerals which are to go on the illustration, should be in pencil (block capitals) on a covering sheet of transparent paper. Lettering or numerals to go at the side should be written there in pencil (block capitals); photographs, for this purpose, should be mounted on card. If the author wishes the block-maker to pay special attention to reproducing any part of an illustration, he should indicate this on the transparent paper. Photographs should be glossy bromide prints.

Proofs. Authors will receive one set of proofs for correction and return to the Editor. Authors may be required to pay for an excessive number of alterations in proof, apart from printer's errors.

Reprints. Authors will receive fifty free reprints. Additional copies may be ordered for purchase when proofs are returned to the Editor.

Journal of
Embryology and Experimental Morphology

[J. Embryol. exp. Morph.]

VOLUME 2

September 1954

PART 3

Contents

NIEUWKOOP, P. D., and NIGTEVECHT, G. V.	
Neural Activation and Transformation in Explants of Competent Ectoderm under the Influence of Fragments of Anterior Notochord in Urodeles	175
FICQ, ADRIENNE	
Analyse de l'induction neurale chez les Amphibiens au moyen d'organisateurs marqués	194
With 2 plates	
FICQ, ADRIENNE	
Localisation et dosage du lithium dans les embryons d'Amphibiens	204
With 1 plate	
HÖRSTADIUS, SVEN, and GUSTAFSON, TRYGGVE	
The Effect of Three Antimetabolites on Sea-Urchin Development	216
FAURÉ-FREMIET, E.	
Morphogénèse de bipartition chez <i>Urocentrum turbo</i> (Cilié holotriché)	227
TOIVONEN, SULO	
The Inducing Action of the Bone-marrow of the Guinea-pig after Alcohol and Heat Treatment in Implantation and Explantation Experiments with Embryos of <i>Triturus</i>	239
With 2 plates	
BOOUNOUR, LOUIS, AUBRY, RÉGINE, et HUCK, MARIE-LOUISE	
Nouvelles recherches expérimentales sur les origines de la lignée reproductrice chez la Grenouille rousse	245
With 2 plates	
ABERCROMBIE, M., FLINT, M. H., and JAMES, D. W.	
Collagen Formation and Wound Contraction during Repair of Small Excised Wounds in the Skin of Rats	264